

LOKALISIERUNG UND FUNKTION VON SYNAPTISCHEN PROTEINEN IN DER NETZHAUT VON SÄUGETIEREN

genehmigte
Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades
der Technischen Universität Darmstadt am Fachbereich
Biologie D17

Vorgelegt von
Monika Altwein
geb. in Darmstadt

1. Referent: PD Dr. L. Peichl
2. Referent: Prof. Dr. P. Layer
3. Referent: Prof. Dr. W. Himstedt

eingereicht am: 15.05.2003
Mündliche Prüfung: 04.07.2003

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 1 |
| 1.1 | Die Retina | 1 |
| 1.1.1 | Signalverarbeitung in der Retina..... | 2 |
| 1.1.2 | Synapsen in der Retina..... | 3 |
| 1.1.3 | Elektrische Synapsen | 3 |
| 1.1.4 | Chemische Synapsen..... | 4 |
| 1.2 | Chemische Synapsen in der Retina | 5 |
| 1.2.1 | Konventionelle Synapsen..... | 5 |
| 1.2.2 | Band-Synapsen..... | 6 |
| 1.3 | Signalübertragung an chemischen Synapsen..... | 7 |
| 1.3.1 | Exozytose | 8 |
| 1.3.2 | Die Rolle des SNARE-Komplexes in der Exozytose..... | 9 |
| 1.4 | Unc13-Proteine | 11 |
| 1.4.1 | Charakterisierung der Unc13 Proteine | 11 |
| 1.4.2 | Munc13-1 | 11 |
| 1.4.3 | Munc13-2 | 12 |
| 1.4.4 | Munc13-3 | 12 |
| 1.5 | Ziel der Arbeit..... | 13 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 14 |
| 2.1 | Versuchstiere..... | 14 |
| 2.2 | In-Situ-Hybridisierung..... | 14 |
| 2.2.1 | Sondenherstellung | 14 |
| 2.2.1.1 | RNA Isolierung..... | 15 |
| 2.2.1.2 | cDNA Einzelstrang-Synthese aus RNA: | 15 |
| 2.2.1.3 | Amplifizierung der cDNA aus Vektor und RNA | 16 |
| 2.2.1.4 | PCR zur Sondenherstellung | 16 |
| 2.2.1.5 | Herstellung von spezifischen Sonden für Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3..... | 17 |
| 2.2.2 | Herstellung von Vibratomschnitten für die <i>In-Situ</i> -Hybridisierung..... | 18 |
| 2.2.2.1 | <i>In-Situ</i> -Hybridisierung an frei schwimmenden Vibratomschnitten | 19 |
| 2.2.2.1.1 | Farbnachweis durch Antikörperfärbung..... | 19 |
| 2.3 | Retinapräparation | 19 |
| 2.4 | Herstellung einer organotypischen Retinakultur | 20 |
| 2.4.1 | Präparation | 20 |
| 2.4.2 | Anlegen der Kultur..... | 20 |
| 2.5 | Immunzytochemische Methoden..... | 20 |
| 2.5.1 | Lichtmikroskopie | 21 |
| 2.5.1.1 | Herstellung von Gefrierschnitten bei <i>in-vivo</i> -Retina | 21 |
| 2.5.1.2 | Herstellung von Gefrierschnitten einer organotypischen Retinakultur..... | 21 |
| 2.5.1.3 | Immunzytochemische Färbung von Retinagefrierschnitten | 22 |
| 2.5.2 | Elektronenmikroskopie | 22 |
| 2.5.2.1 | Herstellung von Vibratomschnitten | 22 |
| 2.5.2.2 | „Preembedding“ Immunzytochemie..... | 23 |
| 2.5.2.2.1 | Standard-elektronenmikroskopische Untersuchungen | 23 |
| 2.5.2.2.2 | Toluidinblau-Färbung von Eponschnitten | 24 |
| 2.5.3 | Kontrollen | 24 |
| 2.6 | Mikroskopische Analyse | 24 |
| 2.7 | Elektroretinogramm (ERG) | 25 |
| 2.8 | Verwendete Lösungen und Chemikalien..... | 26 |
| 2.8.1 | Eingesetzte Primer | 26 |
| 2.8.2 | Lösungen..... | 27 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.8.3 | Chemikalien | 30 |
| 2.8.4 | Antikörper | 31 |
| 2.9 | Geräte und sonstige Hilfsmittel | 33 |
| 2.10 | Bezugsquellen | 33 |
| 3 | ERGEBNISSE | 35 |
| 3.1 | Lokalisierung von Munc13 in der Retina | 35 |
| 3.1.1 | <i>In-Situ</i> Hybridisierung | 35 |
| 3.1.2 | Lichtmikroskopische Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 | 36 |
| 3.1.3 | Zelluläre Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 | 39 |
| 3.1.3.1 | Expression von Munc13-1 und Munc13-3 an Stäbchen-Bipolarzellen | 40 |
| 3.1.3.2 | Expression von Munc13-1 in Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen | 42 |
| 3.1.4 | Lokalisierung von Munc13-1/Munc13-3 an der Photorezeptor-Band-Synapse | 43 |
| 3.1.5 | Synaptische Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 in der IPL | 45 |
| 3.1.6 | Elektronenmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an den Synapsen in der OPL und IPL | 46 |
| 3.2 | Untersuchungen zur Funktion von Munc13-2 und Munc13-3 in der Retina | 47 |
| 3.2.1 | Immunzytochemische Analyse der Munc13-2 und Munc13-3-knock-out-Retinae | 49 |
| 3.2.1.1 | Die Neurone der Munc13-2 und Munc13-3-ko Retina sind unverändert | 49 |
| 3.2.1.2 | Analyse der Synapsen in den Munc13-2 und Munc13-3-ko-Retinae | 50 |
| 3.2.1.3 | Ultrastrukturelle Analyse der Synapsen von Munc13-2 und Munc-13-3 Knock-out-Retinae | 54 |
| 3.2.2 | Elektroretinogramm (ERG) | 56 |
| 3.3 | Untersuchungen einer organotypischen Retina-Kultur der Munc13-1-ko-Maus | 58 |
| 3.3.1 | Immunzytochemische Analyse der Munc13-1-KO organotypischen Retinakultur | 59 |
| 3.3.1.1 | Horizontal-, Amakrin-, Bipolar-, Ganglien und Gliazellen | 60 |
| 3.3.1.2 | Stäbchen-Bipolarzellen | 60 |
| 3.3.1.3 | Lichtmikroskopische Analyse der Synapsen in der Munc13-1-ko-Kultur | 62 |
| 3.3.1.3.1 | Die Präsynapse | 62 |
| 3.3.1.3.2 | Die Postsynapse | 63 |
| 3.3.2 | Ultrastrukturelle Untersuchung der Synapsen in der organotypischen Kultur der Munc13-1-knock-out-Retina | 64 |
| 4 | DISKUSSION | 66 |
| 4.1 | Verteilung und Funktion von Munc13 an den Synapsen des Gehirns | 66 |
| 4.2 | Munc13 in der Retina | 67 |
| 4.2.1 | Munc13-1 ist ein präsynaptisches Protein an der Photorezeptor-Bandsynapse | 67 |
| 4.2.2 | Munc13-1 und Munc13-3 sind postsynaptische Proteine | 69 |
| 4.2.3 | Munc13 Expression an den verschiedenen Synapsen der IPL | 70 |
| 4.2.3.1 | An den Band-Synapsen der Bipolarzellen wird kein Munc13 exprimiert | 71 |
| 4.2.3.2 | Munc13 Proteine werden an konventionellen Amakrinzell-Synapsen exprimiert | 71 |
| 4.3 | Die Bedeutung von Munc13-2 und Munc13-3 für die Retina | 72 |
| 4.4 | Die Bedeutung von Munc13-1 für die Retina | 73 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 76 |
| 6 | ANHANG 1 | 77 |

| | |
|------------------------|-----------|
| 7 ANHANG 2..... | 78 |
|------------------------|-----------|

| | |
|-------------------------|-----------|
| 8 LITERATUR..... | 80 |
|-------------------------|-----------|

1 Einleitung

Lichtempfindlichkeit, also die Fähigkeit auf elektromagnetische Wellen zu reagieren, ist nicht zwangsläufig an das Vorhandensein spezifischer Sinnesorgane geknüpft. Allerdings besitzen viele Tiere ein solches spezielles Organ, ein Auge, das in verschiedenen Ausführungen vorhanden sein kann: von einfachen Pigmentbecherocellen, wie sie z.B. bei Strudelwürmern (*Dendrocoelum lacteum*) vorkommen, bis hin zu bildentwerfenden Augen mit einem dioptrischen Apparat, wie ihn Säugetiere besitzen. (Czihak, Langer, Ziegler, 1992). Die molekulare Grundlage der Lichtwahrnehmung bei Tieren beruht universell auf Rhodopsinen, membrangebundenen Chromoproteinen. Diese Proteine sind im Wirbeltierauge in den Photorezeptoren der Retina lokalisiert. Einfallendes Licht wird zunächst durch den dioptrischen Apparat, der aus Hornhaut, Linse und Glaskörper besteht, gebündelt und auf die Retina projiziert. In der Retina wird das Licht in elektrische Signale umgewandelt, verarbeitet und über den optischen Nerv zum visuellen Kortex weitergeleitet.

Die Retina der Säugetiere entsteht während der Ontogenese als Ausstülpung des Diencephalons und ist damit ein Teil des Gehirns.

1.1 Die Retina

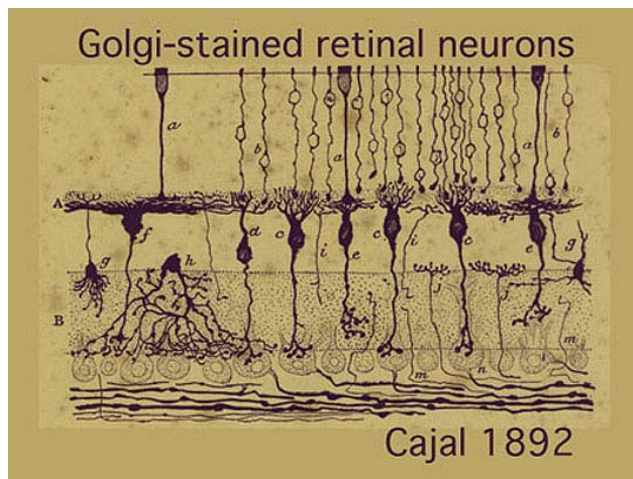


Abb. 1: Zeichnung Cajals von Golgi gefärbten Neuronen der Retina, Vertikalschnitt

Die Retina ist ein Bestandteil des Zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist, je nach Spezies, zwischen 0,1–0,4 mm dick und kleidet den Augenhintergrund aus. Die Retina enthält 5 prinzipielle Nervenzellklassen: Die Photorezeptoren, die das Licht perzipieren, Bipolarzellen, die das Signal der Photorezeptoren empfangen und an die Ganglienzellen und Amakrinzellen weiterleiten, sowie Horizontalzellen und Amakrinzellen, die

die horizontale Verarbeitung und Integration der Signale übernehmen (Rodieck, 1998).

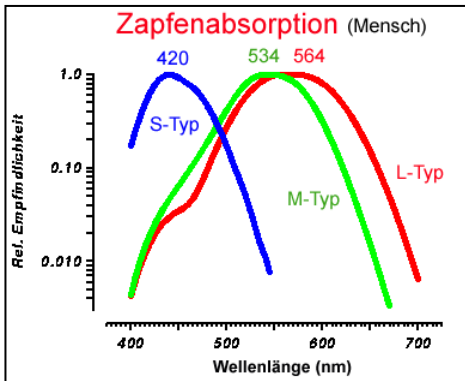


Abb.2

<http://www.egbeck.de/skripten/12/bs12-39.htm>

Bei den Photorezeptoren unterscheidet man zwei Arten: Stäbchen und Zapfen. Die Zapfen sind für das photopische Sehen und für das Farbsehen zuständig, die Stäbchen für das skotopische Sehen. Beim Menschen können die Photorezeptoren das Spektrum der elektromagnetischen Wellen von etwa 380 nm (violett) bis 760 nm (rot) wahrnehmen (Luo, 1999). Die Ausstattung der Photorezeptoren mit verschiedenen Sehpigmenten variiert zwischen den Arten.

1.1.1 Signalverarbeitung in der Retina

Die Photorezeptoren liegen auf der äußeren, dem Licht abgewandten Seite des Auges. In ihren äußeren Segmenten befinden sich die Sehpigmente und die Proteine, die zur Umwandlung der Lichtsignale in elektrische Signale benötigt werden. Die Zellkörper der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (ONL, engl.: outer nuclear layer). An die ONL schließt sich die äußere plexiforme Schicht (OPL, engl.: outer plexiform layer) an, hier werden die von den Photorezeptoren generierten elektrischen Signale an die nachgeschalteten Neurone weitergeleitet. Die Weiterleitung erfolgt über Synapsen, die von den Photorezeptoren mit Bipolarzellen und Horizontalzellen gebildet werden. Die Somata dieser Zelltypen liegen zusammen mit den Zellkörpern der Amakrinzellen in der inneren Körnerschicht (INL, engl.: innere nuclear layer). In der darauf folgenden inneren plexiformen

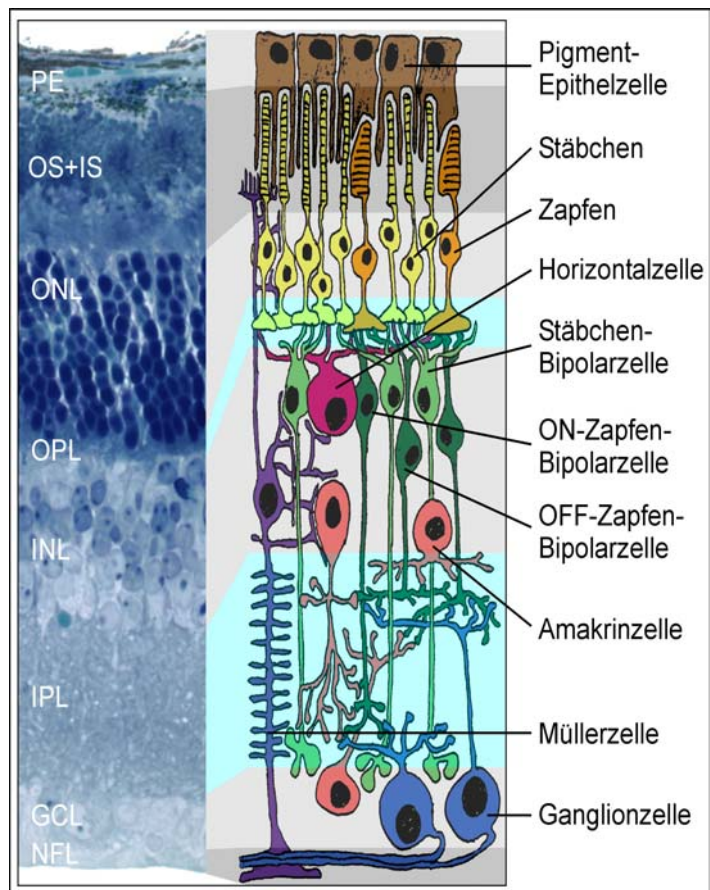


Abb. 3: Toluidinblau gefärbter Vertikalschnitt durch die Retina mit vereinfachtem Schema rechts daneben. PE = Pigmentepithelium (Pigmentepithel); OS+IS = outer/inner Segments (äußere und innere Segmente), ONL = outer nuclear layer (äußere Körnerschicht), OPL = outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht), INL = inner nuclear layer (innere Körnerschicht), IPL = inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht), GCL = ganglion cell layer (Ganglienzellschicht), NFL = nerve fiber layer (Nervenfaserschicht)

Schicht (IPL, engl.: inner plexiform layer) werden die Signale der Bipolarzellen auf die Amakrinzellen und Ganglienzellen übertragen.

Man kann zwei Signalverarbeitungswege unterscheiden: (I) den vertikalen Signalfluss von Photorezeptor über Bipolarzelle zu Ganglienzelle, in dem der Neurotransmitter Glutamat verwendet wird, und (II) den horizontalen Weg, in dem in der OPL die Horizontalzellen mit dem Neurotransmitter GABA und in der IPL die Amakrinzellen mit GABA oder Glyzin das glutamaterge Signal lateral durch Inhibition modulieren (Wässle und Boycott, 1991, Peichl, 1992, Brandstätter *et al.*, 1998). Diese unterschiedliche Signalverarbeitung findet an verschiedenen Typen von Synapsen statt, die im folgenden Kapitel vorgestellt werden.

1.1.2 Synapsen in der Retina

Synapsen sind hochspezialisierte Kontaktstellen zwischen zwei oder mehr Neuronen. An diesen Kontaktstellen findet die Signalübertragung von einer präsynaptischen Nervenzelle auf eine postsynaptische Nervenzelle statt. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Typen von Synapsen.

1.1.3 Elektrische Synapsen

Bei elektrischen Synapsen ist eine besonders schnelle Übertragung gewährleistet, weil hier ein direkter zytoplasmatischer Kontakt zwischen den Zellen besteht.

Gap junctions stellen eine solche elektrische Synapse dar: hier wird durch Connexone ein Proteinkanal gebildet, der den Intrazellulärspalt überbrückt. Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa, wie z.B. anorganische Ionen oder auch Glyzin können diesen Kanal passieren (Kandel *et al.*, 1996; Vaney *et al.*, 1998). Die Modulation des Kanals erfolgt z.B. über den pH-Wert oder die Phosphorylierung der Kanalproteine. Die Übertragung an elektrischen Synapsen kann in weniger als 0,1ms stattfinden (Wehner und Gehring, 1995).

In der Retina findet man elektrische Synapsen in beiden plexiformen Schichten: In der OPL sind Zapfen untereinander durch gap junctions verbunden; in der IPL findet man sie z.B. zwischen Stäbchenbipolarzellen und Typ AII-Amakrinzellen und zwischen AII-Amakrinzellen untereinander (Wässle und Boycott, 1991, Veruki und Hartveit, 2002).

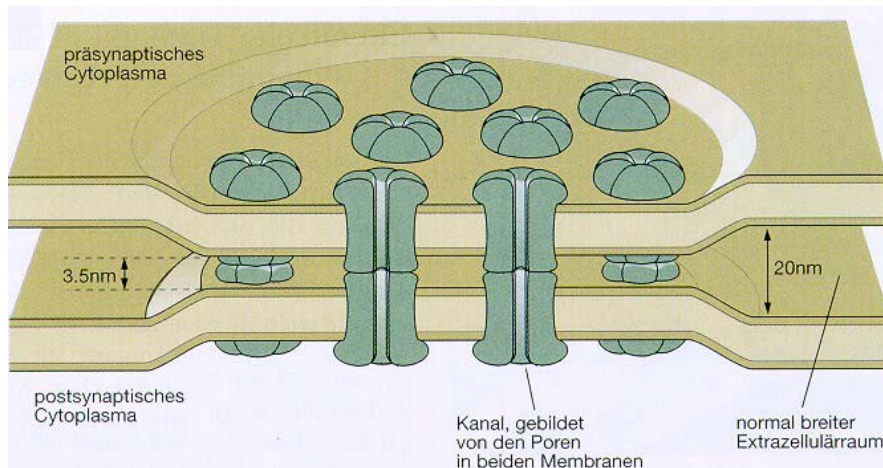


Abb.4: elektrische Synapse mit Connexonen übernommen von Kandel *et al.* (1996). Schematische Darstellung einer elektrischen Synapse, mit angeschnittenen Kanälen. Ein Kanal wird von den Connexonen der prä- und postsynaptischen Seite gebildet.

1.1.4 Chemische Synapsen

Chemische Synapsen sind hochspezialisierte Kontaktstellen zwischen Neuronen. Bei chemischen Synapsen besteht kein direkter Zell-Zellkontakt, sondern die Kommunikation erfolgt indirekt durch Freisetzung chemischer Botenstoffe an der Präsynapse. Diese Botenstoffe diffundieren über den synaptischen Spalt zur Postsynapse und binden dort an spezifische Rezeptorproteine. Es gibt verschiedene Neurotransmitter, die man grundsätzlich in exzitatorische und inhibitorische einteilen kann. Zu den exzitatorischen Transmittern zählt das Glutamat, während z.B. γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glyzin inhibitorische Transmitter sind. Der Neurotransmitter liegt innerhalb der präsynaptischen Zelle in Vesikeln vor.

Die vesikuläre Freisetzung des Neurotransmitters nennt man Exozytose. Dieser Vorgang ist ein präzises Zusammenspiel verschiedener Proteine an der Präsynapse. Den Bereich der Präsynapse, an dem die Exozytose stattfindet, nennt man aktive Zone. Die aktive Zone ist charakterisiert durch eine spezielle Proteinausstattung. Im Elektronenmikroskop erscheint sie als elektronendichte Struktur mit einer Anhäufung von Vesikeln und Cytomatrixproteinen, die hier ein dichtes Netz bilden. Auch an der Postsynapse ist eine solche Struktur zu finden, sie wird als Postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet und liegt genau gegenüber dem Ort der Vesikelausschüttung. Auch hier handelt es sich um ein dichtes Netz von Proteinen, deren Zusammensetzung sich aber von denen der Präsynapse unterscheidet.

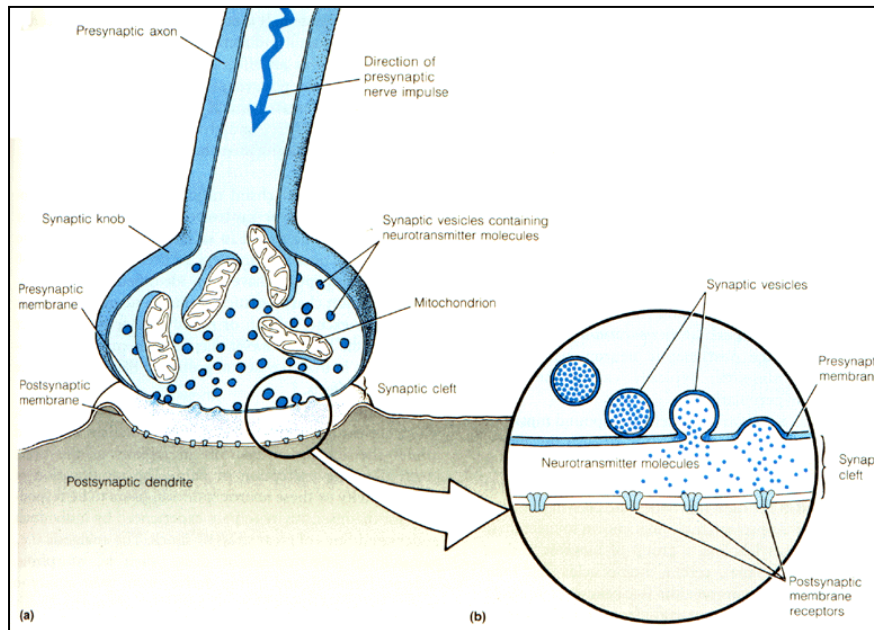


Abb. 5: [Quelle: bio.winona.msus.edu/berg/ILLUST/synapse2.GIF] Schematische Darstellung einer chemischen Synapse. Die Präsynapse besteht aus dem oft verdickten Ende eines Axons (synaptic knob). In der Präsynapse befinden sich verschiedene Proteine, die zur Freisetzung des Neurotransmitters an der präsynaptischen Membran (presynaptic membrane) benötigt werden. Der Neurotransmitter befindet sich in synaptischen Vesikeln (synaptic vesicles), in denen er zur aktiven Zone transportiert wird. Die Postsynapse enthält die Rezeptoren für den Neurotransmitter. Diese sind in der postsynaptischen Membran (postsynaptic membrane) verankert.

1.2 Chemische Synapsen in der Retina

In der Retina kommt neben der konventionellen chemischen Synapse, die typisch für die meisten Neurone im ZNS ist, noch ein weiterer Synapsentyp vor, die sogenannte Band-Synapse. Band-Synapsen gibt es nicht nur in der Retina, sondern auch im Pinealorgan (Hopsu und Arstilla, 1964), in der Cochlea (Smith und Sjöstrand, 1961) und im Vestibular-Organ (Flock, 1964). Konventionelle chemische Synapsen und Band-Synapsen unterscheiden sich in ihrer Morphologie und in ihrer Funktion.

1.2.1 Konventionelle Synapsen

Konventionelle Synapsen sind charakterisiert durch (I) eine präsynaptische und eine postsynaptische Nervenzelle, (II) eine präsynaptische aktive Zone mit einer Anhäufung von synaptischen Vesikeln und (III) eine postsynaptische Dichte mit den Rezeptoren für die entsprechenden Neurotransmitter. Als Neurotransmitter werden vorwiegend GABA, Glyzin und Azetylcholin freigesetzt. Man findet die konventionellen Synapsen in der Retina in der

OPL an Fortsätzen von Horizontalzellen und in interplexiformen Zellen, in der IPL an den Fortsätzen der Amakrinzellen (Kidd, 1962; Dowling und Boycott 1966). Meist ist die Freisetzung des Transmitters an konventionellen Synapsen phasisch (DeVries und Baylor, 1993).

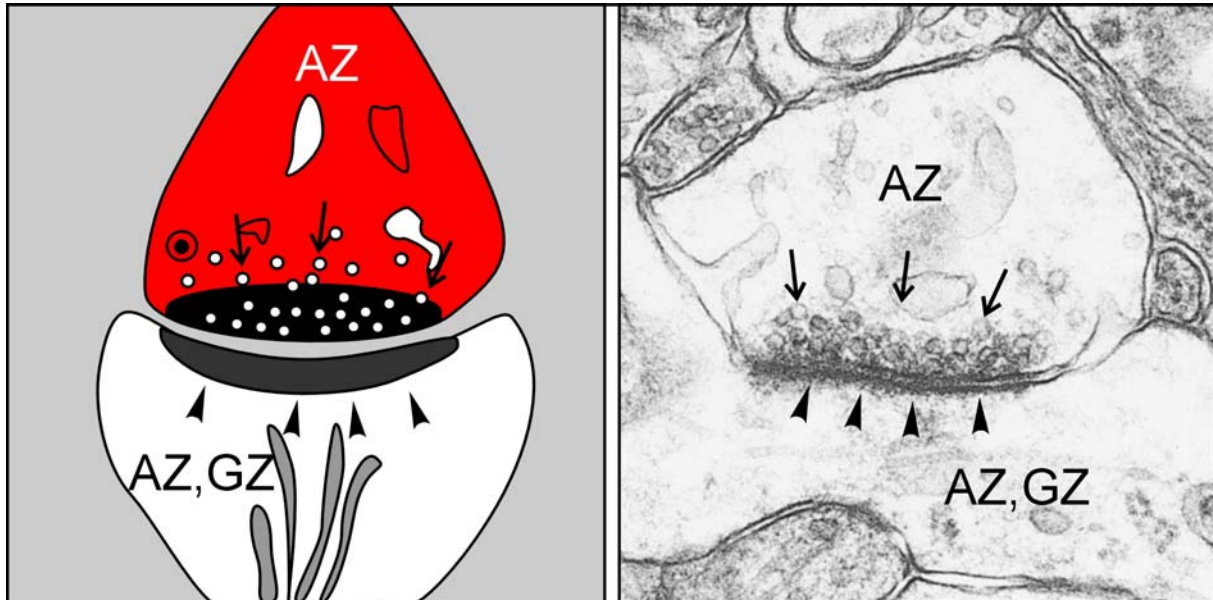


Abb.6: Schema und elektronenmikroskopisches Bild einer konventionellen chemischen Synapse. In der Präsynapse (rot) findet man synaptische Vesikel (Pfeile) gegenüber der postsynaptischen Dichte (Pfeilspitzen). Die postsynaptische Zelle ist entweder eine Amakrinzelle (AZ) oder eine Ganglienzelle (GZ).

1.2.2 Band-Synapsen

Die Band-Synapsen der Retina findet man in beiden plexiformen Schichten: Sie kommen in der OPL in den Photorezeptorterminalien vor und in der IPL in den Bipolarzellterminalien. (Sjöstrand, 1958; Kidd, 1962; Missotten, 1965; Dowling und Boycott, 1966)

Die Bandsynapse ist charakterisiert durch (I) eine präsynaptische und mehrere postsynaptische Nervenzellen, (II) eine bandförmige, elektronendichte Struktur an der Präsynapse, die der Bandsynapse ihren Namen gab (Sjöstrand, 1953), und (III) synaptischen Vesikeln, die mit dünnen Stielchen dem Band aufsitzen (Wagner, 1997; Rao-Mirotnik *et al*, 1995). Als Transmitter verwenden die Bandsynapsen Glutamat. Die Ausschüttung von Glutamat an der Bandsynapse ist immer tonisch, wobei die Menge von der Stärke der Erregung des Photorezeptors bzw. der Bipolarzelle abhängt (DeVries und Baylor, 1993).

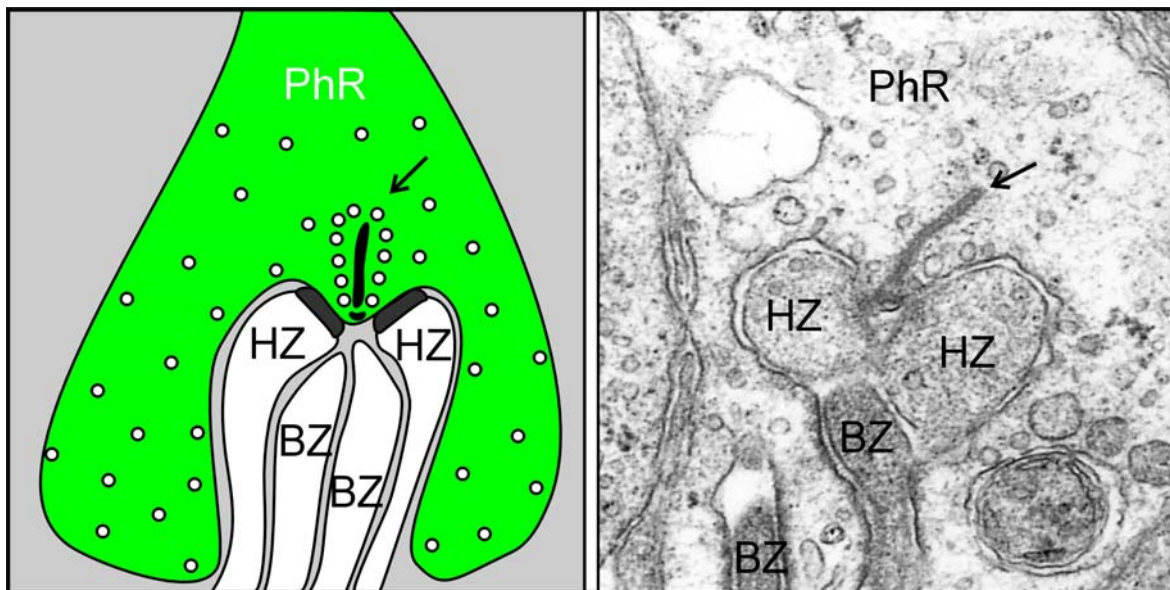


Abb. 7: Schema und elektronenmikroskopisches Bild einer Stäbchen-Band-Synapse. In der Präsynapse (grün) findet man das synaptische Band umgeben von synaptischen Vesikeln (Pfeil). Die Postsynapse besteht bei der Photorezeptor-Band-Synapse aus mehreren Elementen: den Fortsätzen von Horizontal (HZ) und den Dendriten von Bipolarzellen (BZ).

1.3 Signalübertragung an chemischen Synapsen

Um Informationen möglichst zuverlässig übertragen zu können, muss die Vesikelfreisetzungs-kapazität an der konventionellen Synapse mit der Geschwindigkeit und der Häufigkeit ankommender Aktionspotentiale mithalten. Das ist nur dann möglich, wenn in der Nervenendigung ein Ca^{2+} -Signal in Bruchteilen einer Millisekunde in Neurotransmitterfreisetzung umgesetzt werden kann. Durch Vesikelverschmelzung (Fusion) verbrauchte Vesikel müssen sehr schnell recycelt werden, indem transmittergefüllte Vesikel in sehr

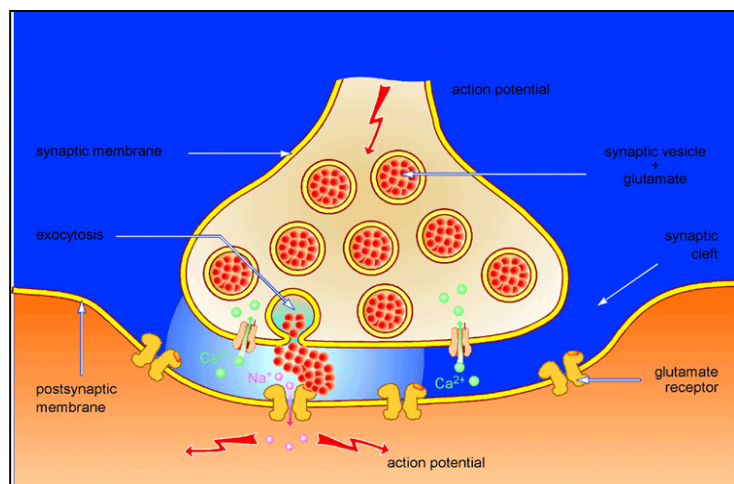


Abb. 8: Schematische Darstellung der Vesikelfreisetzung an einer chemischen Synapse. Synaptic membrane: Membran der Präsynapse; exocytosis: Exocytose = Freisetzung von Neurotransmitter; postsynaptic Membrane: Membran der Postsynapse; action potential: Aktionspotential; glutamate receptor: Glutamatrezeptoren; synaptic cleft: synaptischer Spalt zwischen Prä- und Postsynapse; synaptic vesicle + glutamate: mit Glutamat gefüllter synaptischer Vesikel; Na^+ , Ca^{2+} = Natrium, b.z.w. Kalzium Ionen (<http://www.em.mpg.de/User/Brose/Profile.html>)

kurzer Zeit zur Zellmembran gebracht (docking) und dort fusionskompetent gemacht werden (priming). Dieser Vorgang wird als Exozytose bezeichnet.

1.3.1 Exozytose

Kommt ein Aktionspotential in der Präsynapse an, so führt die Spannungsänderung hier zu einem Einstrom von Ca^{2+} durch spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle. Dies führt zu einer Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran und der Transmitterfreisetzung, der Exozytose (tom Dieck und Gundelfinger, 2000).

Der Exozytose-Kreislauf kann grob in neun Schritte unterteilt werden (Abb.9):

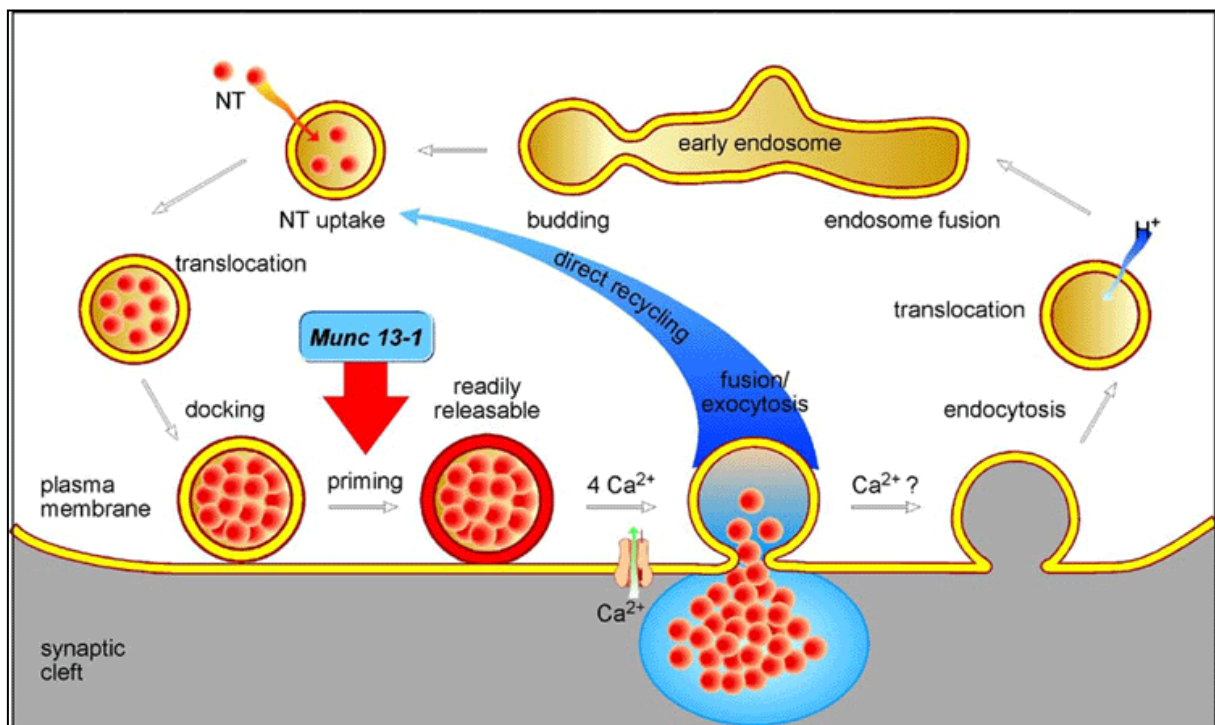


Abb.9: Exozytose (<http://www.em.mpg.de/User/Brose/Profile.html>) Erklärung siehe Text

1. Docking: Mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel „docken“ an der aktiven Zone an.
2. Priming: Das Priming ist ein Reifungsprozess, der den angedockten Vesikel darauf vorbereitet, nach einem Ca^{2+} -Stimulus mit der Plasmamembran zu fusionieren. Vesikel, die nicht durch diesen Reifungsprozess gehen, können nicht mit der Membran fusionieren.
3. Fusion/Exocytose: Geprimte Vesikel werden durch Ca^{2+} stimuliert, um schnell mit der Plasmamembran zu fusionieren. Die Ca^{2+} -getriggerte Fusion dauert weniger als 0.3ms
4. Endocytose: Leere Vesikel werden schnell wieder in den Kreislauf aufgenommen, indem sie zu clathrin-bedeckten Membran-Vesikeln werden.

5. Translokation: Die clathrin-bedeckten Vesikel entledigen sich der Clathrin-Hülle, und werden im Inneren der Zelle wieder aufbereitet.
6. Endosom-Fusionierung: Wieder aufbereitete Vesikel fusionieren mit frühen Endosomen.
7. Budding: Durch „Knospung“ (budding) vom Endosom werden die Vesikel regeneriert.
8. Aufnahme von Neurotransmitter: Durch aktiven Transport akkumulieren die Vesikel Neurotransmitter.
9. Translokation: Mit Neurotransmitter gefüllte Vesikel werden zur aktiven Zone gebracht, entweder durch Diffusion oder durch einen Transportprozess des Zytoskeletts. Der gesamte Kreislauf dauert in etwa 1min, davon nehmen die Fusion/Exozytose weniger als 1ms und die Endozytose weniger als 5s in Anspruch (Südhof, 1995).

1.3.2 Die Rolle des SNARE-Komplexes in der Exozytose

Das „Priming“ der Vesikel erfordert zuvor die Bildung des sogenannten SNARE-Komplexes [SNARE=SNAP Rezeptoren, SNAP=Soluble-NSF-attached-proteins, NSF=N-ethylmaleimide-sensitive Fusions-Proteine] (Sutton *et al* , 1998; Jahn und Südhof, 1999; Lin und Scheller, 2000; Fasshauer *et al*, 1998 a und b). Dieser Komplex besteht aus einer Assoziation verschiedener Vesikel- und Membranproteine, die ermöglichen, daß der Vesikel an der Plasmamembran andocken und fusionieren kann.

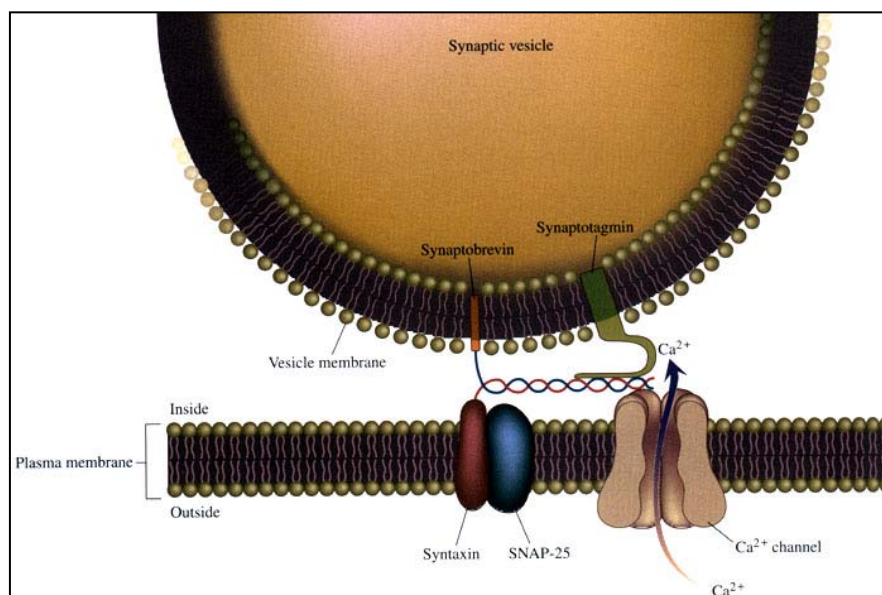


Abb.10: Annäherung eines synaptischen Vesikels an die präsynaptische Plasmamembran als Vorbereitung zur Exozytose. Der genaue Mechanismus wird im Text erklärt Quelle: <http://www.pharyngula.org/~pzmyers/neuro/synapse/index.php?print>

Der SNARE-Komplex besteht aus drei Proteinen: Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin. Diese Proteine erlauben die Verankerung des synaptischen Vesikels an der aktiven Zone.

Annähern der Vesikel an die Membran:

Die Bindung von Munc18 an Syntaxin verhindert die Bildung des SNARE-Komplexes. Erst wenn diese Interaktion gelöst wird, kann Syntaxin an SNAP-25 binden; es entsteht eine hochaffine Bindungsstelle für Synaptobrevin, und der SNARE-Komplex kann gebildet werden. Man nimmt an, daß Munc13-1 für das Lösen der Interaktion zwischen Syntaxin und Munc18 verantwortlich ist (Südhof, 1995; Hata *et al*, 1993; Misura, *et al*, 2000; Richmond *et al*, 2001; Rizo und Südhof, 2002; Sassa *et al*, 1999; Betz *et al*, 1997).

Fusion:

Der angedockte Vesikel braucht, um mit der Plasmamembran fusionieren zu können, ein weiteres Protein, das NSF. NSF ist ein Trimer, das multiple SNARE-Komplexe in einem Netzwerk verbinden und durch ATP-Hydrolyse auflösen kann (Söllner *et al*, 1993). Die Hydrolyse resultiert in einer Hemifusion des Vesikels mit der präsynaptischen Membran.

Kalzium:

Kalzium ist als Auslöser (Trigger) notwendig, um die Fusion zu vervollständigen. Als Kalziumsensor kommen mehrere Proteine in Frage: einerseits Synaptotagmin (Weber *et al*, 1998; Otter-Nilsson, 1999; Brugger *et al*, 2000;), der SNARE-Komplex selber (Fasshauer 1998 a und b, Sörensen *et al*, 2002,) oder Complexin I und II (Reim *et al*, 2001).

Recycling der Vesikel:

Direkt nach der Fusion werden die Vesikel in einem Kreislauf recycled.

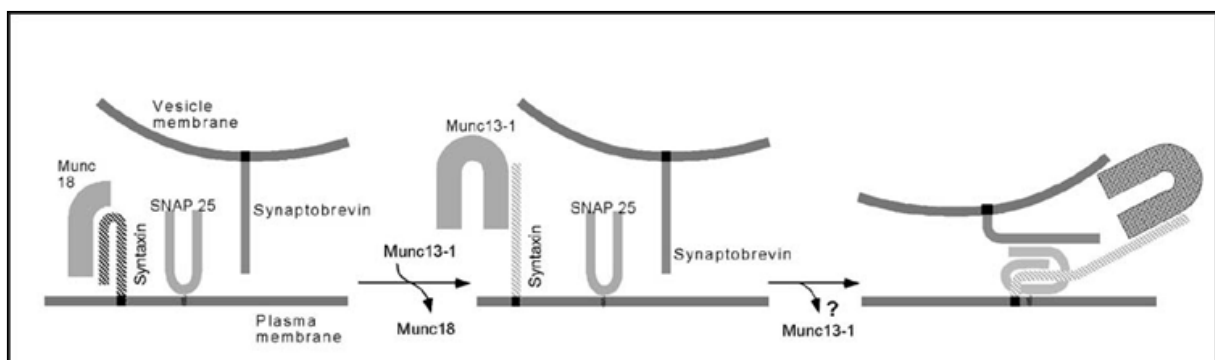


Abb. 11: Schema der Vorgänge bei der Bildung des SNARE Komplexes, Erklärung dazu im Text Quelle: (<http://www.em.mpg.de/User/Brose/Profile.html>)

1.4 Unc13-Proteine

In den vorangegangenen Kapiteln wurden die molekularen Vorgänge bei der Signalübertragung an der chemischen Synapse erklärt. Dabei spielen viele Proteine eine Rolle. Dieses Kapitel beschäftigt sich mit einer Familie von Proteinen, die bei der Signalübertragung an der Synapse eine essentielle Rolle spielen und ein Schwerpunkt in der vorliegenden Dissertation sind, nämlich die Unc13-Proteine. Bei Untersuchungen von Mutanten des Nematoden *Caenorhabditis elegans* fand man viele Mutationen, die sich in einer unkoodinierten Motorik der Tiere widerspiegeln (Brenner, 1974). Die Unc13-Proteine (engl.: uncoordinated) spielen eine Rolle bei der synaptischen Übertragung, wo sie als DAG/Phorbolrezeptor (DAG=Diacylglycerol) auftreten (Richmond *et al*, 1999; Aravamudan *et al*, 1999; Betz *et al*, 1998 ; Maruyama und Brenner, 1991).

Man findet die Proteine dieser Familie hochkonserviert in fast allen Tieren.

1.4.1 Charakterisierung der Unc13 Proteine

Unc13 und deren Homologe haben im Carboxyterminal eine C1-Domäne, die homolog zur PKC-Diacylglycerol-Bindungsstelle operiert, und zwei C2-Domänen, die entweder als Kalzium/Phospholipid-Bindungsstelle oder als Protein-Interaktionsstelle dienen kann.

In *C. elegans* sind mindesten zwei Unc13-Varianten exprimiert (Kohn *et al*, 2000), deren C-Terminus hochkonserviert und deren N-Terminus variabel ist. In *Drosophila* gibt es drei Varianten, bei denen ebenfalls der C-Terminus hochkonserviert und der N-Terminus verschieden ist.

1.4.2 Munc13-1

Munc13 ist das Homolog zu Unc13 im Säuger. Bei Säugern gibt es 3 Gene, nämlich für Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3. Sie haben alle eine konservierte C1 und C2 Domäne, die sich über die letzten zwei Drittel des Proteins erstrecken (Brose *et al*, 2000). Die N-Termini der Proteine unterscheiden sich. Munc13-1 wurde zunächst als neues Zielmolekül des „Diacylglycerol 2nd messenger pathways“ beschrieben, das parallel zu PKC in der Neurotransmitter-Regulation agiert und im Experiment die Freisetzung von Neurotransmitter verstärkt (Betz *et al*, 1998). Munc13-1 ist ein peripheres Membran-Protein, das in Synaptosomen angereichert ist, an synaptischen Membranen lokalisiert ist, aber nicht an

synaptischen Vesikeln vorkommt (Brose *et al*, 1995). Die Interaktion von Munc13-1 mit Syntaxin (Betz *et al*, 1997) wurde bereits in Kapitel 1.3.2. beschrieben.

Überexpression von Munc13-1 führte in Chromaffinzellen und an der neuromuskulären Endplatte von *Xenopus* zu einer erhöhten Fusionsrate von Vesikeln (Betz *et al*, 1998; Ashery, *et al* 2000). Elektrophysiologische Untersuchungen an Hippocampuskulturen von Munc13-1 knock-out Mäusen konnten dessen Funktion bei der Freisetzung von Neurotransmitter bestärken. Das Fehlen des Proteins führt an den meisten glutamatergen Synapsen (90%) dazu, daß die angedockten Vesikel nicht geprimt werden können und damit keine Transmitterfreisetzung stattfindet (Augustin *et al*, 1999 b; Brose *et al*, 2000). An den Synapsen des Gehirns wird Munc13-1 ubiquitär exprimiert (Augustin *et al*, 1999 a).

1.4.3 Munc13-2

Munc13-2 ist wie Munc13-1 ein Phorbol ester/DAG-Rezeptor. Die Funktion von Munc13-2 ist noch nicht vollständig aufgeklärt, es gibt jedoch starke Hinweise dafür, daß es ebenfalls ein Priming-Faktor bei den restlichen 10% der glutamatergen Synapsen sowie bei GABAergen bzw. inhibitorischen Synapsen ist (Augustin *et al* 1999 b, Varoqueaux *et al*, 2002; Rosenmund *et al*, 2002, Rhee *et al*, 2002).

Im Gegensatz zu Munc13-1 kommt Munc13-2 nicht ubiquitär vor: im Gehirn wird Munc13-2 nur im zerebralen Kortex, Hippocampus und Striatum exprimiert.

1.4.4 Munc13-3

Das dritte der drei hirnspezifischen Munc13 Proteine ist Munc13-3. Über die synaptische Funktion von Munc13-3 ist bislang nur wenig bekannt. Man weiß immerhin, daß Munc13-3 eine Rolle bei Plastizitätsvorgängen im Gehirn spielen könnte (Augustin *et al*, 2001; Yang *et al*, 2002). Munc13-3 wird hauptsächlich im Zerebellum exprimiert.

1.5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Retinae von Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 knock-out Mäusen und soll klären helfen, welche synaptischen Proteine für die Entwicklung einer morphologisch und funktionell intakten Retina wichtig sind. Munc13-Proteine haben eine essentielle Bedeutung bei der Signalübertragung an chemischen Synapsen: Munc13-1 und Munc13-2 sind Priming-Faktoren bei der Exocytose. Die Funktion von Munc13-3 hingegen ist noch unbekannt.

Das Fehlen von Munc 13-1 und Munc13-2 an der Synapse bewirkt, daß synaptische Vesikel nicht mehr mit der Plasmamembran fusionieren können und als Folge davon kein Neurotransmitter mehr freigesetzt werden kann. Ohne Munc13-1 und Munc13-2 kann also keine Signalübertragung an chemischen Synapsen stattfinden. Obwohl in den Mausmutanten die Munc13-1/Munc13-2 abhängigen Synapsen nicht mehr aktiv sind, hat man bei den Synapsen im Hippocampus keine morphologischen Unterschiede gefunden. Das ist interessant und rätselhaft. Bis heute ist noch nicht aufgeklärt, welche Faktoren für die Ausbildung funktionell und morphologisch intakter Synapsen verantwortlich sind, und es ist offen, ob Aktivität dabei eine Rolle spielt (Tessier-Lavigne und Goodman, 1996; Tarsa und Goda 2002; Constantine-Paton und Cline, 1998). Weil man weiß, daß die Synapsen des Hippocampus bei den Munc13-1/13-2 knock-out Mäusen keine auffälligen Veränderungen zeigen, ist es wichtig und spannend, die Auswirkung in einem weiteren gut untersuchten Teil des ZNS zu analysieren. Hier bietet sich die Retina als Modellsystem an. Es sollte an den knock-out Mäusen untersucht werden, ob die Inaktivität der Synapsen Auswirkung auf (I) die Ausbildung der gesamten Anatomie der Retina, (II) die Ausbildung einzelner Zellgruppen oder (III) die Ausbildung der synaptischen Schichten, sowie die Synapsen selber hat.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Experimente zur Lokalisierung der Proteine Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 wurden Albino-Ratten (*Rattus norvegicus*) und wildtypische Mäuse (C57Bl6) verwendet. Die untersuchten knock-out Mäuse wurden am MPI für experimentelle Medizin generiert, mit PCR genotypisiert und für die vorliegende Studie zur Verfügung gestellt. Für die Analyse wurden Knock-out Mäuse für Munc13-1 (Augustin *et al.*, 1999 b), Munc13-2 (Varoqueaux *et al.*, 2002) und Munc13-3 (Augustin *et al.*, 2001) verwendet. Die Datenbank Zugangsnummer für die veröffentlichten Sequenzen (Acc.Nos. of published sequences) Munc13-1 :U24070; bMunc13-2: U24071 ; ub Munc13-2:AF59706; Munc13-3 : U24072 bzw. U75361; Munc13 renal (mouse) AF115848.

2.2 In-Situ-Hybridisierung

Bei der *In-Situ*-Hybridisierung wird im Gewebeschnitt (*in situ*) mit spezifischen Sonden (ein DNA- oder RNA-Abschnitt) die Existenz bestimmter Nukleinsäuresequenzen nachgewiesen. Diese Technik hat gegenüber der PCR den Vorteil, daß zugleich eine morphologische Zuordnung der Sequenzen vorgenommen werden kann.

Die Sonden-RNA ist mit Digoxigenin (DIG) markiert. Diese Markierung erlaubt den Nachweis der Sonde mit einem Antikörper, an den z.B. alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Diese reagiert mit dem Substrat 5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate (BCIP)/nitroblue tetrazolium (NBT) und erlaubt damit einen Farbnachweis im Gewebe.

Durch die katalytische Aktivität des Enzyms (Phosphatase) wird die Phosphatgruppe des BCIP abgespalten. Gleichzeitig wird durch die Alkalische Phosphatase NBT reduziert. In dephosphorylierter Form erscheint BCIP blau, die reduzierte Form von NBT bildet einen violetten schwerlöslichen Niederschlag und gemeinsam ergeben beide Farbstoffe ein blauviolettcs Präzipitat.

Die *In-Situ*-Hybridisierung wurde an den Retinae von Ratten und Mäusen durchgeführt.

2.2.1 Sondenherstellung

Die Sondenherstellung erfolgte aus cDNA. Die cDNA lag für die Rattensequenzen in Expressionsvektoren (pcDNA3-Munc13-1, pEGFP-bMunc13-2, pcDNA3-Munc13-3) vor, die

von Prof. Dr. Nils Brose (MPI für experimentelle Medizin Göttingen) zur Verfügung gestellt wurden. Die cDNA für die Mausequenzen wurde aus isolierter RNA hergestellt.

2.2.1.1 RNA Isolierung

Das RNA-Template zur Herstellung der cDNA-Sonde mußte zuerst aus murinem Retinagewebe gewonnen werden. Die Isolierung der RNA erfolgte nach Vorschrift des mRNA-Isolierungs KIT von Qiagen: RNeasy Mini von Qiagen (no: 74104) Protokoll für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe. Die Retina wurde wie in 1.3 beschrieben isoliert und auf Eis gelagert. Dann wurde das Gewicht der Retina bestimmt, da die Mengen der zugegebenen Substanzen gewichtsabhängig sind. Es wurden zunächst 6 Retinae isoliert, mit einem Gesamtgewicht von 15mg => 1 Retina ~ 2,5mg. Das Gewebe wurde mit 350µl Homogenisierungspuffer in einem Glashomogenisator homogenisiert (kurz). Anschließend wurde das Homogenat in einer Einwegspritze mit gelber Kanüle ~8 mal aufgezogen, um die DNA zu scheren. Es wurde bei 13 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand (~ 300µl) auf eine Säule geben. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen (300µl) 70% Ethanol gegeben und 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule mit 700µl der Lösung RW1 gewaschen und nochmals 15 Sekunden bei 10 000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluß wurde wieder verworfen und die Säule mit 500µl der Lösung RPE gewaschen, in ein neues Gefäß überführt und 15 Sekunden bei 10 000 RPM zentrifugiert. Wiederum wurde der Durchfluß verworfen und die Säule mit 500µl der Lösung RPE gewaschen und noch einmal für 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert.

Dann wurde die RNA eluiert, indem die Säule mit 50µl DEPC Wasser gewaschen wurde. Anschliessend wurde noch einmal für 60 Sekunden zentrifugiert. Mit einem Photometer wurde jetzt der RNA-Gehalt bestimmt (hier: 0,6µg/µl). Schließlich wurde die RNA mit Natriumazid und 70% Ethanol gefällt und bei -70°C gelagert.

2.2.1.2 cDNA Einzelstrang-Synthese aus RNA

Zunächst wurden 2 Ansätze vorbereitet:

| | |
|----------|---|
| 1 | 10,5 µl RNA (0,6µg/µl) + 1µl oligo primer (dT) (500µg/µl) (Quiagen) |
| 2 | 10,5 µl RNA (0,6µg/µl) + 1µl random hexamer Primer (100µg/µl) (Quiagen) |

Beide Ansätze wurden für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und im Anschluss die Reaktion auf Eis gestoppt.

Zu jedem der beiden Ansätze wurden jeweils

- 4µl first strand buffer
- 2µl DTT
- 1µl 10mM dNTP

gegeben, für 30 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert und sofort zu beiden Ansätzen jeweils

- 0,5µl RNase Inhibitor

gegeben, gut durchmischt und 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Dann wurde jeweils

- 1µl Superscript II

zugefügt und die Ansätze für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde für 15 Minuten die Temperatur auf 70°C erhöht.

2.2.1.3 Amplifizierung der cDNA aus Vektor und RNA

Die cDNA wurde durch PCR amplifiziert, um anschliessend spezifische Sonden für Munc13-1, Munc 13-2 und Munc 13-3 herzustellen.

Ein Vergleich der Sequenzen von Munc13-1, -2 und -3 mit Hilfe einer Gendatenbank ergab, daß die Gene in weiten Bereichen homolog sind. Daher wurden die Primer aus Bereichen gewählt, in denen keine hohen Homologien bestehen, damit eine Spezifität der späteren Sonde gewährleistet ist. Die Primerpaare sind jeweils komplementär für eine spezifische Sequenz, die für Munc13-1, Munc13-2 oder Munc13-3 codierende DNA-Abschnitte flankieren. Ferner wurde den Primern eine Sequenz zugewiesen: U-T3 für den oberen Primer (upper) und eine L-T7 Sequenz im unteren Bereich (lower). Diese Sequenzen sind Zielsequenzen für RNA-Polymerasen, die später zur Sondenherstellung eingesetzt wurden.

Die Sequenzen der Primer, sowie die Länge der Sonden sind in Tabelle 1 , Kapitel 1.8 aufgeführt.

2.2.1.4 PCR zur Sondenherstellung

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (englisch: polymerase chain reaction, PCR) werden DNA-Abschnitte *in vitro* exponentiell vervielfältigt. Um nur bestimmte DNA-Abschnitte zu amplifizieren, werden spezifische Oligonukleotidpaare, die den entsprechenden Abschnitt flankieren, der PCR als „Primer“ zugesetzt. Ein DNA-Doppelstrang wird mittels Aufheizen auf 95°C aufgespalten. Damit sich die Primer an die entsprechenden komplementären DNA-Sequenzen der DNA-Einzelstränge setzen können, wird die Temperatur dann auf etwa 65 °C (Temperatur ist abhängig von der Länge der Primer-Sequenz) gesenkt und kurz konstant gehalten. Anschließend wird auf 72°C temperiert, um die DNA-Neusynthese mittels der

DNA-Polymerase zu starten. Dabei wird die DNA in 5'-3'-Richtung unter Verwendung von Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) gebildet. Durch eine erneute Erhöhung der Temperatur auf 95°C wird die Neusynthese der DNA abgebrochen und die komplementären Stränge lösen sich wieder voneinander. An dieser Stelle beginnt der Zyklus erneut. Nach 40 Zyklen liegen ausreichend Kopien der gewünschten DNA-Abschnitte für eine Nachweisreaktion vor.

Die PCR wurde folgendermassen durchgeführt:

Man erstellte zunächst einen sogenannten MASTERMIX nach Qiagen für 4 Ansätze:

- 20µl 10x PCR Puffer
- 20µl 2mM dNTPs
- 115µl bidestilliertes Wasser

Dann wurden, in 3 Ansätzen, jeweils

- 5µl Primer 1 (entsprechend Munc13-x –U-T3)
- 5µl Primer 2 (entsprechend Munc13-x-L-T7)
- 1µl cDNA (aus RNA oder Vektor)

vorgelegt. Zum „Mastermix“ wurde nun

- 1,5µl Taq Polymerase

gegeben und gut durchmischt. Es wurde zu jedem der 3 Ansätze mit der DNA jeweils

- 39µl „Mastermix“

gegeben.

Dieser PCR-Ansatz wurde in einem Thermocycler inkubiert, wobei die DNA, wie oben beschrieben, amplifiziert wurde.

Nach der PCR liegt linearisierte DNA vor, aus der die spezifischen Sonden hergestellt wurden.

2.2.1.5 Herstellung von spezifischen Sonden für Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-1

Die DNA wurde nun durch RNA-Polymerasen in mRNA umgeschrieben

20ml Ansatz

- 12,5µl steriles DEPC Wasser
- 2µl 10x Transkriptions Puffer

- 2µl 10x NTP Mix DIG markierte UTP
- 1µl linearisiertes Plasmid/bzw cDNA (1µg/µl)
- 0,5µl RNase Inhibitor
- 2µl T7 /bzw U3 RNA Polymerase 20U/ml

Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert

und mit

- 2,5µl LiCl
- 75µl 70% Ethanol

für 2 Stunden bei –20°C gefällt.

Im Anschluss wurde für 10 Minuten zentrifugiert, und der Rückstand in 70% kalten Ethanol gewaschen. Das Ethanol wurde vorsichtig abgenommen und der Rückstand an der Luft getrocknet. Danach wurde der Rückstand in 100µl eines Wasser-Hybridisierungspuffer-Gemisches mit dem Verhältnis 1:5 wieder gelöst. Nun lagen RNA-Sonden für die spezifische Hybridisierung vor, die bei –20°C gelagert wurden.

2.2.2 Herstellung von Vibratomschnitten für die *In-Situ*-Hybridisierung

Mäusen (C57Bl6) und Ratten (*Rattus norvegicus*) wurden nach Dekapitierung die Augen sowie das gesamte Gehirn entnommen und sofort in 4% Paraformaldehyd (PFA) bei 4°C für 2 Stunden fixiert. Die im Anschluss aus den Augenbechern isolierten Retinae (siehe 1.3) und das sagittal in zwei Hälften geteilte Gehirn wurden über Nacht in frischem PFA weiterfixiert.

Um Vibratomschnitte anzufertigen, wurde das Gewebe für ca. 1 Minute in 10% Glutaraldehyd (GA) überführt und dann sofort in einem BSA-Gelatine-Mix mit 1/10 Volumen GA eingebettet. Dabei war darauf zu achten, daß das Gewebe gleichmässig von dem Mix umgeben war und keine Luftblasen entstanden. Das eingebettete Gewebe wurde in kleinen Blöckchen ausgeschnitten und in 1x PBST auf Eis aufbewahrt. Mit dem Vibratom wurden davon Gewebeschnitte von ca. 70µm Dicke angefertigt und zunächst einzeln in Multiwell-Platten in PBST gesammelt. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in einer aufsteigenden Methanolreihe (25%, 50%, 75% , 2x 100%) dehydriert.

Das Gewebe konnte nun in 100% Methanol bei –20°C bis zu 6 Monate gelagert werden.

2.2.2.1 *In-Situ*-Hybridisierung an frei schwimmenden Vibratomschnitten

Das Gewebe wurde zuerst in einer absteigenden Methanolreihe (in umgekehrter Reihenfolge des Dehydrierens) rehydriert.

Im Anschluss wurde für 10 Minuten in 6% H₂O₂ gebleicht und 2x5 Minuten in PBST gewaschen. Auf das Gewebe wurde jetzt die Prähybridisierungslösung gegeben und bei 65°C für mindestens 3 Stunden vorhybridisiert.

Danach wurde die Prähybridisierungslösung durch die Hybridisierungslösung, die die Sonden in einer Verdünnung von 1:100 enthielt, ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C. Am nächsten Tag wurde das Gewebe 2x10 Minuten und danach 2x30 Minuten in 1xSSC und für 2x30 Minuten mit 0,2xSSC bei 65°C gewaschen. Das Gewebe wurde auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und im Anschluss 3x10 Minuten in 1xTBST bei RT gewaschen.

2.2.2.1.1 *Farbnachweis durch Antikörperfärbung*

Die Gewebeschnitte wurden für 3 Stunden in 10% hitzeinaktiviertem Schafserum blockiert und anschliessend mit einer Antikörperlösung (Anti DIG AP Fragment) 1:3000 in 1% hitzeinaktiviertem Schafserum über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe 2x10 Minuten und 4x1 Stunde in 1xTBST und 2x10 Minuten in NTMT gewaschen. Das NTMT wurde durch die Färbelösung, die BCIP und NBT enthält, ersetzt. Die Reaktion muss wegen der Lichtempfindlichkeit der Substanzen im Dunkeln stattfinden. Nachdem die Färbung die gewünschte Intensität erreicht hatte, stoppte man die Reaktion durch 2x10 Minuten waschen mit NTMT (im Dunkeln). Die Färbung wurde mit 4% PFA und 0,1% GA nachfixiert. Im Anschluss wurde mit PBS (pH 3-4) und über Nacht in 25% Glycerol in PBS (pH 6.3) bei 4°C gewaschen. Das Gewebe wurde in Kaisers Gelatine eingedeckelt.

2.3 *Retinapräparation*

Die Versuchstiere wurden mit Halothan betäubt, durch Dekapitieren getötet und danach die Augen entnommen. Die Augen der Tiere wurden entlang des Cornea-Randes geöffnet, indem man mit einem Skalpell die Hornhaut einstach und mit einer Mikroschere entlang der ora serrata schnitt. Dann wurden die Hornhaut und die Linse mit dem anhaftenden Glaskörper mit einer Pinzette vorsichtig beseitigt. Die Retina wurde nun entweder im Augenbecher fixiert oder vorsichtig aus dem Augenbecher isoliert, ohne sie direkt zu berühren.

2.4 Herstellung einer organotypischen Retinakultur

Da homozygote Munc13-1 knock-out Mäuse innerhalb weniger Stunden nach der Geburt sterben, wurden zur Untersuchung dieser Retinae organotypische Kulturen angelegt.

2.4.1 Präparation

Trächtige heterozygote Munc13-1 Weibchen wurden durch Dekapitieren getötet. Für die Organentnahme wurden per Kaiserschnitt am Tag E18 (am Tag vor der Geburt) Embryonen entnommen. Die Embryonen wurden durch Dekapitieren getötet, die Augen wurden entnommen und in kaltes Medium (Dulbecos MEM Nährlösung) gegeben.

Für die Genotypisierung wurde den Embryonen jeweils ein Stück des Schwanzes sowie das vollständige Gehirn entnommen.

2.4.2 Anlegen der Kultur

Die embryonale Retina wurde, wie in 1.3 beschrieben, unter sterilen Bedingungen entnommen.

Die freipräparierte Retina wurde mit der Photorezeptorseite auf einen Nitrocellulosefilter gelegt. Der Filter wurde anschließend für ca. 1 Minute an der Luft angetrocknet und dann mit einem Tropfen (ca. 5µl) Matrigel auf ein Glasplättchen geklebt. Das Glasplättchen, das als Träger für das Explantat diente, wurde in ein Schrägröhrchen überführt, das anschließend mit 1 ml Zellkulturmedium gefüllt wurde. Die Inkubation der Explantate erfolgte in einem Rollerbrutschrank bei 37°C unter ständiger Drehung (15 rpm).

Der Mediumwechsel wurde 24 Stunden nach der Präparation und im folgenden alle 2 Tage durchgeführt. Die Retinaexplantate wurden für 15 Tage (Days-In-Vitro = DIV15) in Kultur gehalten.

2.5 Immunzytochemische Methoden

Bei der Fixierung musste ein Kompromiss zwischen bestmöglichem Gewebeerhalt und den geeigneten Bedingungen für die Immunreaktivität des Antikörpers eingegangen werden. Einige der verwendeten Antikörper waren sehr fixierempfindlich, deswegen wurden für die immunzytochemischen Färbungen entsprechend optimierte Fixierungszeiten verwendet.

2.5.1 Lichtmikroskopie

2.5.1.1 Herstellung von Gefrierschnitten bei *in-vivo*-Retina

Die Fixierung der Retina erfolgte im Augenbecher mit 4% PFA bei RT. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Fixierdauer richtete sich nach der Fixierempfindlichkeit der verwendeten Antikörper, und wurde auf 15 bzw. 30 Minuten festgelegt. Nach dem Fixieren wurden die Retinae 3x10 Minuten in PBS gewaschen, um das PFA möglichst rückstandslos zu entfernen. Danach wurden die Retinae für jeweils eine Stunde in 10% und danach 20% Saccharose auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Retinae vorsichtig aus den Augenbechern herauspräpariert und über Nacht in 30% Saccharose mit 0,01% Natriumazid bei 4°C inkubiert. Das zugegebene Natriumazid soll einen Keimbefall verhindern. Die Inkubation in der aufsteigenden Saccharosereihe dient dem Gefrierschutz, um die Retina für das Schneiden im Gefriermikrotom vorzubereiten.

Am nächsten Tag wurden die Retinae für mindestens 15 Minuten bei 4°C im Kühlschrank in Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissuetec Freezing Medium, Reichert Jung) inkubiert. Für die Untersuchung der Retinae der Munc13 knock-out Mäuse wurden jeweils eine WT und eine KO Retina plan übereinander aufgefroren. Von diesen sogenannten Sandwichpräparaten wurden mit einem Gefriermikrotom (Leica CM3050s) bei einer Objekttemperatur von -21°C und einer Kammertemperatur von -18°C zwölf Mikrometer dicke Vertikalschnitte angefertigt und davon jeweils drei Schnitte auf einen Objektträger aufgebracht. Diese Schnitte wurden entweder sofort für die weiteren Untersuchungen verwendet oder konnten bei -20°C gelagert werden.

Die Methode der Sandwichpräparate hat den Vorteil, daß man bei immunzytochemischen Färbungen die Retinae beider Genotypen mit exakt demselben Protokoll behandelt. Damit sind Unterschiede in der Färbungsintensität nicht auf Variationen bei der Immunfluoreszenz-Färbung zurückzuführen.

2.5.1.2 Herstellung von Gefrierschnitten einer organotypischen Retinakultur

Die organotypischen Retinakulturen wurden grundsätzlich genauso behandelt wie normales Gewebe. Bei der in Kultur gehaltenen Retina wurde zunächst das Kulturmedium dekantiert und durch 2x10 Minuten waschen in PBS möglichst rückstandslos entfernt. Nach 30 Minuten Fixierung in 4% PFA und 3x Waschen in PBS wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Saccharosereihe (10%, 20%, 30%) inkubiert.

Die *in vitro* Retina wurde zusammen mit dem Nitrocellulosefilter vom Glasplättchen gelöst, da das Entfernen des Filters die Retina zerstört hätte. WT und KO Retina wurden im Sandwichformat (s.o.) aufgefroren und 16µm dicke Gefrierschnitte hergestellt.

2.5.1.3 Immunzytochemische Färbung von Retinagefrierschnitten

Die Retina-Schnitte wurden für 15 Minuten bei RT aufgetaut, mit einem Fettstift, (Pap-Pen, siehe Tab. 5) umrandet und 2x10 Minuten in PBS gewaschen.

Dann wurden die Schnitte für 1 Stunde mit Präinkubationsmedium in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen im Gewebe, wie hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken-Bindungen, abzusättigen. Dies verhindert, daß die in den späteren Schritten verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper an diesen unspezifischen Stellen binden. Nach der Präinkubation erfolgte die Inkubation mit den entsprechend verdünnten Antikörpern (in Primär-Antikörper-Inkubationslösung) über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 Minuten in PBS gewaschen, um ungebundenen Primär-Antikörper aus dem Gewebe zu entfernen. Die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern (in Sekundär-Antikörper-Inkubationslösung) erfolgte für 1 Stunde im Dunkeln in einer feuchten Kammer. Im Anschluss wurde 3x15 Minuten in PBS im Dunkeln gewaschen. Es ist notwendig alle Schritte ab dem Sekundär-Antikörper im Dunkeln durchzuführen, da die an den Antikörper gekoppelten Fluorochrome lichtempfindlich sind.

Anschließend wurden die Schnitte mit einem Kunstharz (Aqua-Poly-Mount) eingedeckt und im Kühlschrank bei 4°C bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt. Die so hergestellten Färbungen sind über einige Wochen haltbar.

2.5.2 Elektronenmikroskopie

2.5.2.1 Herstellung von Vibratomschnitten

Zur Herstellung von Vibratomschnitten wurde die Retina im Augenbecher für 50 Minuten in 4% PFA fixiert und in einem aufsteigenden Saccharose-Gradienten (10%, 20%, 30%) inkubiert. Danach wurde die Retina zur Verbesserung der Antikörperpenetration mehrere Male über einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Messingblock gefroren und wieder aufgetaut. Nach dem Waschen der Retina in PBS wurde die Retina in kleine Stücke zerteilt, die einzeln in 4% Agar/PBS-Lösung eingebettet wurden. Der Agarblock wurde trapezförmig zurechtgeschnitten, in 0-4°C kaltem PBS abgekühlt und mit Sekundenkleber auf einer

Kunststoffplatte befestigt. Mit einem Vibratom (Vibratome series 1000 und Leica VT 1000 S) wurden 50 µm dicke Vertikalschnitte angefertigt.

2.5.2.2 „Preembedding“ Immunzytochemie

Die Vibratomschnitte wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1-2 Stunden in der Präinkubationslösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper für 4 Tage bei 4°C. Nach viermaligem Waschen in PBS (15 Minuten, RT) wurden die Schnitte mit einem biotinylierten, speziesspezifischen Sekundär-Antikörper inkubiert (2 Stunden, RT). Anschließend konnten die Bindungsstellen der Primär-Antikörper mit an Avidin gekoppelter Meerrettichperoxidase (enzymatisches Detektionssystem: Vectastain Elite ABC Kit) und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Substrat sichtbar gemacht werden. Dann wurden die Schnitte in 0,1M Cacodylat-Puffer gewaschen und durch Zugabe von 2,5% GA für zwei Stunden bei 4°C nachfixiert. Um das Reaktionsprodukt DAB durch Silberintensivierung und Goldchloridbehandlung in eine elektronendichte Markierung zu überführen, wurden die Schnitte für zehn Minuten in einer Lösung aus 2,6% Hexamethylentetramin, 0,2% Silbernitrat und 0,2% Borax bei 60°C inkubiert, gefolgt von einer je dreiminütigen Inkubation in 0,05%iger Gold(III)-Chlorid-Chlorwasserstoffsäure und 2,5% Natriumthiosulfat. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Gewebe gründlich mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Minuten bei 4°C in 0,05% Osmium-Tetroxid (OsO₄) in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) nachfixiert. Auf die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100% Ethanol für je 15 Minuten) und Propylenoxid (5 Minuten) folgte die Einbettung der Schnitte in einem Harz auf Glycidether-100-Basis (Serva, Heidelberg). Das Harz musste für mindestens 48 Stunden bei 60°C polymerisieren. Von den so behandelten Gewebestücken wurden am Ultramikrotom (Ultracut, Reichert) Ultradünnschnitte von 50-70 nm Dicke für elektronenmikroskopische Untersuchungen angefertigt.

2.5.2.2.1 Standard-elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für optimalen Gewebeerhalt wurden etwa 3x3 mm große Retinastücke für 2 Stunden in einem Gemisch von 2,5% GA und 4% PFA in 0,01M PBS (pH 7,4) fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mehrfach in 0,1M Cacodylatpuffer (CA) gewaschen und danach in einem Gemisch von 1,5% Kalium-Ferro-Cyanid und 1% OsO₄ in 0,1M CA für 2 Stunden nachfixiert. Auf die

Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90% und zweimal 100% Ethanol für je 15 Minuten) und Propylenoxid (5 Minuten) folgte die Einbettung der Schnitte in einem Gemisch aus Propylenoxid und Eponharz (1:1) über Nacht im Abzug. Die Gefäße wurden nicht verschlossen, so daß das Propylenoxid verdampfen konnte. Am darauf folgenden Tag wurden die Retinastücke für 2 Stunden in frischem Eponharz inkubiert, bevor sie mit frischem Epon in kleine Formen gegeben wurden. Anschließend wurden die Formen für 3 Tage bei 60°C aufbewahrt, damit das Epon aushärten konnte. Mittels eines Ultramikrotoms (Ultracut, Reichert) wurden Ultradünnschnitte von 50-70 nm Dicke für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen angefertigt.

2.5.2.2 Toluidinblau-Färbung von Eponschnitten

Von in Epon eingebetteter Retina wurden mit Hilfe eines Ultramikrotoms 1µm dicke Semidünnschnitte hergestellt. Diese wurden mit einem Pinsel auf Objektträger aufgenommen und auf einer auf 60°C temperierten Wärmeplatte getrocknet. Anschließend wurde die Wärmeplatte auf 85°C temperiert und die Toluidinblau-Lösung aufgetropft. Nach ein bis zwei Minuten, in denen immer wieder Toluidinblau-Lösung nachgetropft wurde, damit die Schnitte nicht eintrocknen, wurde dann mehrfach kurz in Aqua dest. gewaschen. Dann wurden die Schnitte wiederum bei 60°C getrocknet und mit Aqua Polymount eingedeckt.

2.5.3 Kontrollen

Um ausschließen zu können, daß eine beobachtete Färbung von einer Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit bestimmten Strukturen innerhalb des Gewebes herrührt, wurden die einzelnen Färbungen zur Kontrolle auch ohne Primär-Antikörper durchgeführt. Diese Negativkontrollen ergaben bei keinem Färbeansatz unspezifische Markierungen. Das galt sowohl für die lichtmikroskopischen als auch für die elektronenmikroskopischen Analysen.

2.6 Mikroskopische Analyse

Zur lichtmikroskopischen Analyse der Retinaschnitte wurden die fluoreszierenden Präparate mittels eines konfokalen Laserscanning Mikroskops (LSM5 Pascal, Zeiss) analysiert. Für die Analyse der zellulären Veränderungen wurden mehrere übereinander liegende konfokale Ebenen aufgenommen, so genannte Stacks. Dabei war ein Stack bis zu 12 µm dick, wobei die

Dicke der einzelnen fokalen Ebene bei etwa 0,5 μm lag. Diese Stacks wurden zur besseren Darstellung der zellulären Veränderungen in eine einzelne Ebene projiziert.

Zur lichtmikroskopischen Analyse der Kulturen wurde zusätzlich ein Zeiss Epifluoreszenz-Photomikroskop (Axiophot) benutzt. Zur Anregung der jeweiligen Fluorochrome wurden folgenden Kombinationen von Fluoreszenzfiltern verwendet:

Grüne Fluoreszenz (ALEXATM 488): 450-490, FT 510, LP 520

Rote Fluoreszenz (ALEXATM 594): 546, FT 580, LP 590

Zur Kontrolle der Gewebestruktur wurden die Retinaschnitte zusätzlich mit Durchlicht und Interferenzkontrast aufgenommen.

Zur elektronenmikroskopischen Auswertung der Ultradünnschnitte wurden diese mit einem Zeiss EM 10 Elektronenmikroskop untersucht und Aufnahmen mittels einer digitalen Gatan-Kamera gemacht.

Kontrast und Helligkeit der aufgenommenen digitalen Bilder wurden mit Photoshop 5.0 optimiert und die Bilder dann in Corel Draw 9.0 arrangiert.

2.7 Elektroretinogramm (ERG)

Vor den Experimenten wurden die Tiere für mindestens 12 Stunden dunkeladaptiert. Alle anschließenden Arbeitsschritte wurden unter schwachem Rotlicht durchgeführt. Adulte Munc13-2 und Munc13-3, sowie die dazugehörigen WT Geschwister wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Xylazin (50mg/kg) und Ketamin (20 mg/kg) betäubt. In das abzuleitende Auge wurde eine 1%ige Atropinsulfatlösung getropft, um die Pupille zu erweitern. Für das Experiment wurde die Maus auf die Seite gelegt und mit Klebeband fixiert. Ein ständig mit 0.9% Kochsalzlösung getränkter Baumwollfaden diente als Kontakt zwischen der Silberelektrode (für die Ableitung) und dem Auge. Als Referenzelektrode wurde eine weitere Silberelektrode unter die Kopfhaut geführt und zur Erdung ein Silberdraht in den Schwanz der Maus. Die elektrischen Potenziale wurden mit einem DAM50 Bioamplifier (WPI, Sarasota, USA) aufgenommen und bandpass-gefiltert (1Hz-1000Hz). Die Daten wurden mittels eines MacLab Systems (AD Instruments, Hastings, UK), das auf einem Apple PowerPC installiert war, gemittelt und gespeichert. Vollfeld-Beleuchtung und Hintergrund-Beleuchtung wurden durch zwei 150W Halogenlampen erzeugt, die auf die Cornea fokussiert

waren. Intensitäten wurden mittels verschiedener Graufilter reguliert und die Lichtblitze mit elektromagnetischen Verschlüssen erzeugt. Die Lichtstärke (lx) von weißem Licht auf Höhe der Cornea wurde mit Hilfe eines kalibrierten Luxmeter (Palux, Gossen GmbH, Nürnberg, Deutschland) festgestellt.

Um das skotopische ERG zu untersuchen, wurden die Reaktionen auf 20 ms dauernde Lichtblitze gemessen. Die Zeit zwischen den Lichtblitzen betrug jeweils 10 s. Dementsprechend waren die Retinae während der Experimente eventuell nicht vollständig dunkeladaptiert. Bei jeder Intensität wurden 16-32 Antworten gemittelt. Für die Analyse wurden die Amplituden der Antworten relativ zur Basislinie gemessen. Die Basislinie wurde als mittlere Spannung innerhalb einer 100 ms dauernden Periode vor dem Lichtblitz gewählt. Die Anstiegszeit (time-to-peak) wurde als Zeitintervall zwischen dem Anschalten des Lichtimpulses und dem Erreichen des Maximums der Antwort gewertet. Die gemittelten Daten sind in den Abbildungen der ERG-Ergebnisse dargestellt.

2.8 Verwendete Lösungen und Chemikalien

2.8.1 Eingesetzte Primer

| Upstream | Downstream | Basenpaare Genom (Munc) | im | Produktlänge (Sondenlänge) |
|---|---|----------------------------|-------|-------------------------------|
| Primer für Maus | | | | |
| <u>mMUNC13-1-U</u> 5'-AGC TAG TCT AGA CCT CCT GGA CGC TCA TTT CGA-3' | <u>mMUNC13-1-L-T7</u> 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAA TTC GCT GAT CCG CTT GAA CTC TTT G-3' | *1471-1491 Primer | upper | 857bp |
| | | *2275-2254 primer | lower | |
| <u>mMUNC13-2</u> | Aus methodischen Gründen konnten keine spezifischen Sonden hergestellt werden | | | |
| <u>mMUNC13-3-U</u> 5'-GCT AGT CTA GAG TGA AGT CTA ATG GCA GTG TAA AA-3' | <u>mMUNC13-3-L-T7</u> 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAA TTC ACA GGG GTG TAG GCA GTT TTA T-3' | *41666-4189 Primer | upper | 761bp |
| | | *4874-4854 primer | lower | |
| Primer für Ratte | | | | |
| <u>Munc13-1-U-T3</u> 5'-CGC AAT TAA | <u>Munc13-1-L-T7</u> 5'-GCG TAA TAC | Gen im Vektor: 1037-6632 | | 1028bp |

| | | | |
|--|---|--|-------|
| CCC TCA CTA AAG GG ACA TCT AGA TCC GGG AGA ATG GCT GAC ACT GG-3' | GAC TCA CTA TAG GGC GAC TCG AGT GCC TTG GGG ATG CCT TTG GAC AC-3' | Primer: 1334-2362 | |
| <u>Munc13-2-U-T3</u> 5'-CGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA AGA CTG GCC AGA AGG GTG TAA GAA TC-3' | <u>Munc13-2-L-T7</u> 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC TCG AGC CCC TGA AGA GCC AA CGG AAG T-3' | Gen im Vektor: 454-6599 Primer: 1400-2243 | 843bp |
| <u>Munc13-3-U-T3</u> 5'-CGC AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA ACA TCT AGA GAA CGG AAA GAG AAA GGG GTA TTA-3' | <u>Munc13-3-L-T7</u> 5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAC TCG AGC AGG GCA TGG AGA AGA GTT GTC-3' | Gen im Vektor: komplett Primer: 1301-2210 | 909bp |
| | | | |

Tabelle 1: Primer für *In Situ* Hybridisierung

**Angaben beziehen sich auf das Rattengenom, weil für die Maus nur eine veröffentlichte Sequenz vorhanden ist.*

2.8.2 Lösungen

| LÖSUNG | REZEPT |
|--|---|
| Phosphatpuffer (PB): [0,2 M] pH 7,4 | <ul style="list-style-type: none"> • 10,86 g Na₂HPO₄ • 1,31 g NaH₂PO₄ mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen |
| Phosphatpuffer (PB): [0,1 M] pH 7,4 | Durch Verdünnen von 1) mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1 |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): [0,01 M] pH 7,4 | <ul style="list-style-type: none"> • 50 ml von 1) • 8,76 g NaCl • 0,2 g KCl mit Aqua dest. auf 1l auffüllen |
| Saccharose 30% | <ul style="list-style-type: none"> • 30 g Saccharose mit PBS auf 100 g auffüllen |
| Saccharose 20% / 10% | <ul style="list-style-type: none"> • 20 ml / 10 ml von 4) • 10 ml / 20 ml PBS |
| | <ul style="list-style-type: none"> • 4 g Paraformaldehyd |

| | |
|---------------------------------------|--|
| Paraformaldehyd (PFA) 4% | mit PB auf 100 g auffüllen (unter ständigem Rühren auf 65 °C erwärmen und anschließend abfiltrieren) |
| Triton Stammlösung 5% | <ul style="list-style-type: none"> • 5 g Triton mit PBS auf 100 g auffüllen |
| Natriumazid Stammlösung 1% | <ul style="list-style-type: none"> • 0,1 g Natriumazid mit PBS auf 10 g auffüllen |
| Präinkubationslösung | <ul style="list-style-type: none"> • 10% NGS (<u>N</u>ormal <u>G</u>oat <u>S</u>erum) • 1% BSA (<u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumine) • 0,5% Triton-X-100 in PBS |
| Primär-Antikörper-Inkubationslösung | <ul style="list-style-type: none"> • 3% NGS • 1% BSA • 0,5% Triton-X-100 • 0,05% NaN₃ (Natriumazid) in PBS |
| Sekundär-Antikörper-Inkubationslösung | <ul style="list-style-type: none"> • 3% NGS • 1% BSA • 0,5% Triton-X-100 in PBS |
| Boraxlösung (1%) | <ul style="list-style-type: none"> • 1 g Borax (di-Na-tetraborat) in 100 ml Aqua dest. |
| Toluidinblau Lösung (0,1%) | <ul style="list-style-type: none"> • 0,1g Toluidinblau in 100 ml Boraxlösung |
| Cacodylat-Puffer (CP) pH 7,4 | <ul style="list-style-type: none"> • 2,14g Dimethylarsinsäure Natriumsalz in 100 ml Aqua dest. |
| TBST | TBS + 0,1% Triton 100 mL TBS + 100µl Triton |
| TBST + Glyzin | 19 mg Glyzin in 5mL TBST + 0,1% Sodiumborohydrit (frisch ansetzen) |
| BSA/Gelatine-Mix | <ul style="list-style-type: none"> • 450 ml PBS • 2,2 g Gelatine • auf 60°C erhitzen • auf RT abkühlen lassen • 70 g BSA zugeben und lösen |
| Prähybridisierungspuffer | Für 1 ml: <ul style="list-style-type: none"> • 100µl 10x Salz; • 500µl de-ionisiertes Formamid (Sigma F5786); • 400µl ddH₂O (DEPC behandelt); • 20mg Boehringer Blocking Reagent (1 |

| | |
|---------------------------------------|--|
| | 096 176); <ul style="list-style-type: none"> • bei 50° inkubieren bis alles gelöst ist |
| Hybridisierungspuffer | Für 1 ml: <ul style="list-style-type: none"> • 100µl 10x Salz; • 500µl de-ionisiertes Formamid (Sigma F5786); • 200µl 50% Dextransulfat (Sigma D8906) • 100µl Hefe RNA (10mg/ml); • 50µl 50x Denhardt's (Sigma D9905) • 80µl ddH₂O (DEPC behandelt) • 20mg Boehringer Blocking reagent (1 096 176) • bei 50° inkubieren bis alles gelöst ist |
| 10x Salz | <ul style="list-style-type: none"> • NaCl 114g • Tris HCl 14.04g • Tris base 1.34g • NaH₂PO₄ * H₂O 7.8g • Na₂HPO₄ 7.1g • 0,5M EDTA 100ml mit ddH ₂ O auf 1l auffüllen, pH 7,5 autoklavieren. |
| 1xSSC | Für 50ml: <ul style="list-style-type: none"> • 2,5 ml 1xSSC (1%) • 25 ml Formamid (Sigma F7503) (50%) • 50µl TritonX 100 (0,1%) |
| 0,2X SSC | Für 50ml: <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 ml 20xSSC (0,2%) • 25 ml Formamid (Sigma F7503) (50%) • 50µl TritonX 100 (0,1%) |
| Lösung II | Für 10ml: <ul style="list-style-type: none"> • 1 ml 5M NaCl (500mM) • 0,1 ml 1M Tris/HCL pH 7.5 (10 mM) • 10µl Tween-20 (0,1%) |
| 10xTBST | <ul style="list-style-type: none"> • 1,4 M NaCl • 27 mM KCl • 0,25 M Tris HCl, pH 7.5 • 1% (Tween-20) or TritonX-100 |
| NTMT | 100ml: <ul style="list-style-type: none"> • 2 ml 5M NaCl (100 mM) • 10 ml 1M Tris HCl, pH 9.5 (100 mM) • 5 ml 1 M MgCl₂ (50 mM) • 100µl 0.1% (Tween-20) oder TritonX-100 |
| NBT/BCIP Färbelösung | <ul style="list-style-type: none"> • 4, 5 µl NBT Stamm und 3,5 µl BCIP Stamm pro 1 ml in NTMT |
| 10x Transkriptionspuffer (Boheringer) | <ul style="list-style-type: none"> • 400mM Tris HCl, pH 8.25 |

| | |
|---|--|
| | <ul style="list-style-type: none"> • 60mM MgCl₂ • 20mM Spermidine |
| 10x NTP Mix (DIG RNA labelling Mix Boehringer 1 277 073) | <ul style="list-style-type: none"> • 10mM GTP • 10mM ATP • 10mM CTP • 6,5mM UTP • 3,5mM Digoxigenin-UTP |
| Zellkulturmedium | <ul style="list-style-type: none"> • 10ml Pferdeserum • 1ml Penicillin/Streptomycin • 0,5ml L-Glutamin 200mM (100Xx) • 2ml Hepes Puffer mit Dulbecos MEM Nährlösung Mix F12 auf 100ml auffüllen |

Tabelle 2: Lösungen

2.8.3 Chemikalien

| CHEMIKALIEN | BEZUGSFIRMA |
|---|--|
| IMMUNZYTOCHEMIE | |
| Borax | Merck 4188182 |
| Borsäure | Sigma, B-0252 |
| Bromphenolblau | Roth A512,1 |
| BSA | Sigma, 10 g, A9647, Bovine Albumine, Fraction V Powder |
| Dimethylarsinsäure Natriumsalz Trihydrat | Merck, 100g Art. Nr. 820670 |
| EDTA | Serva, 11280 |
| Ethidiumbromid | Sigma, E2028 |
| Glycerin | Merck 1.12011 |
| Glyzin | Roth, 3908.2 |
| Halothan | Eurim Pharm, 250 ml |
| KCl | Merck, 500 g, Art. Nr. 1.04936 |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck, 1000 g, Art. Nr. 6574 |
| NaCl | Merck, 1000 g, Art. Nr. 6404 |
| NaH ₂ PO ₄ | Merck, 1000 g, Art. Nr. 6346 |
| Natriumazid | Merck, 100 g, Art. Nr. 822335 |
| NGS | Sigma, 10 ml, G9023 |
| Peanut Agglutinin Fluorescein | Vector |
| Paraformaldehyd | Merck, 1000 g, Art. Nr. 1.04055 |
| Saccharose | Roth, 1000 g, Art. Nr. 4621 |
| Sodiumborohydrit | Sigma, S-9125 |
| Toluidinblau | Merck 1273 |
| Tris-Base | Sigma, T-1503 |
| Tris-HCL | Sigma, T-3253 |
| Triton | Merck, 1 l, Art. Nr. 11869 |
| Xylene Cyanol | Serva 38505 |
| IN SITU HYBRIDISIERUNG | |
| 50x Denhardt's | Sigma, D9905 |

| CHEMIKALIEN | BEZUGSFIRMA |
|-----------------------------------|---|
| BCIP (in dimethylformamide) | Sigma, B6777 |
| BCIP (in H ₂ O) | Sigma, B1026 |
| NBT | Sigma, N6639 |
| BSA | Sigma, A4503 |
| Dextransulfat | Sigma, D8906 |
| Formamid (ultrapur) | Sigma, F5786 |
| Glutaraldehyd | Sigma, G6257 |
| NBT | Sigma, N6639 |
| Paraformaldehyd | Sigma, P6248 |
| Hefe RNA | Sigma, R7125 |
| ORGANOTYPISCHE RETINAKULTUR | |
| Dulbecco's MEM Nährmedium Mix F12 | Life Technologies, 500ml, Art.Nr. 21331-020 |
| Gey's gepufferte Salzlösung | Life Technologies, 500ml, Art.Nr. 24260-028 |
| Halothan | Eurim Pharm, 250 ml |
| L-Glutamin 200mM | Life Technologies, 100ml, Art.Nr. 25030-024 |
| Matrigel | Becton & Dickinson |
| Penicillin/Streptomycin Lösung | Life Technologies, 100ml, Art.Nr. 15140-114 |
| Pferdeserum (10%) | Life Technologies, 500ml, Art.Nr. 26050-047 |

Tabelle 3: Lösungen

2.8.4 Antikörper

| ANTIGEN | ART | ERZEUGT IN | VERWENDETE KONZENTRATION | BEZUGSQUELLE |
|-------------------------|-----|------------|--------------------------|---|
| Bassoon | pAK | rb | 1:8000 | E.D. Gundelfinger, Universität Magdeburg |
| Bassoon | mAK | m | 1:500 | StressGen |
| Calbindin | pAK | rb | 1:2000 | Swant |
| Caldendrin | pAK | rb | 1:2000 | M.Kreutz Universität Magdeburg |
| GluR2/3 | pAK | rb | 1:100 | Chemicon |
| Glutaminsynthetase (GS) | mAK | m | 1:1000 | Transduction |
| Glycin | mAK | rt | 1:1000 | D. Pow University Brisbane |
| Goα | mAK | m | 1:500 | Chemicon |
| NK3 | pAK | rb | 1:200 | Novus Biological |
| Munc13-1 | mAK | m | 1:1000 | Nils Brose; MPI für exp. Medizin |
| Munc13-3 | pAK | rb | 1:3000 | Frederique Varoqueaux; MPI für exp. Medizin |
| Piccolo | pAK | rb | 1:400 / 1:200 | E.D. Gundelfinger, Universität Magdeburg |
| Piccolo | pAK | rb | 1:8000 | E.D. Gundelfinger, Universität Magdeburg |

| | | | | |
|----------------------------|-----|----|---------|---|
| Piccolo | pAK | gp | 1:8000 | E.D. Gundelfinger, Magdeburg |
| PKC | pAK | rb | 1:10000 | Sigma |
| PKC | pAK | gt | | Santa Cruz |
| PKC | mAK | m | 1:200 | Amersham |
| ProSAP1 | pAK | gp | 1:6000 | T. Böckers, Universität Münster |
| PSD-95 | mAK | m | 1:500 | Biomol |
| SNAP-25 | pAK | rb | 1:10000 | Alamone labs |
| Synaptophysin | mAK | m | 1: 3000 | Sigma |
| VGluT1 | pAK | rb | 1:10000 | SySy |
| VIAAT | pAK | rb | 1:2000 | M. Kneussel, MPI für Hirnforschung |
| GABA _A α3R | pAK | gp | 1:6000 | H. Möhler, Universität Zürich |
| GABA _C R (ρ1/2) | pAK | rb | 1:100 | Enz, R Universität Erlangen- Nürnberg |
| mAb7a (Gephyrin) | mAK | M | 1:100 | H. Betz MPI für Hirnforschung |

Tabelle 4: Primär Antikörper

mAK = monoklonaler Antikörper

pAK = polyklonaler Antikörper

m = Maus

rb = Kaninchen (Rabbit)

rt = Ratte

gt = Ziege (goat)

gp = Meerschweinchen (guinea pig)

| ANTIKÖRPER | ANREGUNG (NM) | EMISSION (NM) | VERDÜNNUNG | HERSTELLER |
|-------------------|------------------|------------------|------------|--------------------------|
| gαm ALEXA™ 488 | 495 | 519 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαm ALEXA™ 594 | 590 | 617 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαrb ALEXA™ 488 | 495 | 519 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαrb ALEXA™ 594 | 590 | 617 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαgp ALEXA™ 488 | 495 | 519 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαgp ALEXA™ 594 | 590 | 617 | 1:500 | Molecular Probes |
| gαgp biotinyliert | -- | -- | 1:100 | Vector Laboratories Inc. |
| gαgp biotinyliert | -- | -- | 1:100 | Vector Laboratories Inc. |
| gαm biotinyliert | -- | -- | 1:100 | Vector Laboratories Inc. |
| gαrb biotinyliert | -- | -- | 1:100 | Vector Laboratories Inc. |

Tabelle 5: Sekundär-Antikörper

g = Ziege (englisch goat); Tierart in der der Sekundär-Antikörper hergestellt wurde

m = Maus

rb = Kaninchen (englisch rabbit)

gp = Meerschweinchen (guinea pig)

α = gegen Antikörper der Tierart

ALEXATM 488 (grüne Fluoreszenz)

ALEXATM 594 (rote Fluoreszenz)

2.9 Geräte und sonstige Hilfsmittel

| GERÄT / HILFSMITTEL | BEZUGSFIRMA |
|---|---------------------------------------|
| Adobe Photoshop 5.0 | Adobe Systems |
| Aqua-Poly-Mount | Polysciences Europe |
| Axiophot Photomikroskop | Zeiss |
| Corel Draw 8.0 | Corel Corporation |
| Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing medium) | Reichert-Jung, Art. Nr. 0201 08926 |
| Gefriermikrotom | Reichert-Jung, Kryostat Frigocut 2700 |
| Laser-Scanning-Mikroskop LSM5 Pascal | Zeiss |
| Pap-Pen | SCI Science Service |
| PCR-Kit | Qiagen |
| PCR-Primer | Invitrogen |
| Rneasy Mini | Qiagen (Art.nr.: 74104) |
| Scanner (Power Look) | Umax Systems |
| Thermocycler | Biozyme Diagnostik GmbH PTC-200 |
| Thermoschüttler | Eppendorf |

Tabelle 6: Geräte und Hilfsmittel

2.10 Bezugsquellen

| BEZUGSFIRMA | ADRESSE |
|---------------------|---|
| Adobe Systems | Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA |
| Boehringer Mannheim | Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Corel Corporation | Corel Corporation, Ltd., Dublin, Irland |
| Dianova, Hamburg | Dianova, Hamburg, Deutschland |
| Eurim Pharma | Eurim Pharma, Piding, Deutschland |
| Eurogentec | Eurogentec GmbH, Köln, Deutschland |
| ICN Biochemicals | ICN Biochemicals, Frankfurt, Deutschland |
| Invitrogen | Invitrogen, Paisley, Schottland |
| Merck | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Molecular Probes | Molecular Probes, Leiden, Deutschland |
| Pharmingen | Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| Polysciences Europe | Polysciences Europe, Eppelheim, Deutschland |
| Qiagen | Qiagen, Heiden, Deutschland |
| Reichert-Jung | Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland |

| | |
|--------------------------|---|
| Roth | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland |
| SCI Science Service | SCI Science Services GmbH, München, Deutschland |
| Seikagaku | Seikagaku Co., Tokyo, Japan |
| Serva | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Sigma | Sigma Chemical Co., St. Louis, MS, USA |
| Stratagene | Stratagene, Amsterdam, Niederlande |
| Umax Systems | Umax Systems GmbH, Willich, Deutschland |
| Vector Laboratories Inc. | Vector Lab. Inc., Buffingham, CA, USA |
| Zeiss | Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland |

Tabelle 7: Bezugsquellen

3 Ergebnisse

3.1 Lokalisierung von Munc13 in der Retina

Die zelluläre Expression der mRNA von Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 wurde durch *In-Situ*-Hybridisierung an vertikalen Vibratomschnitten der Retina von Ratten und Mäusen untersucht. Die Lokalisierung der Proteine Munc13-1 und Munc13-3 wurde durch immunzytochemische Methoden an vertikalen Gefrierschnitten von Mäusen untersucht.

3.1.1 *In-Situ* Hybridisierung

Die *In-Situ* Hybridisierung von vertikalen Vibratomschnitten der Rattenretina mit mRNA-Sonden gegen die Sequenzen von Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3 zeigt eine unterschiedliche zelltypspezifische Verteilung der drei mRNAs (Abb.12).

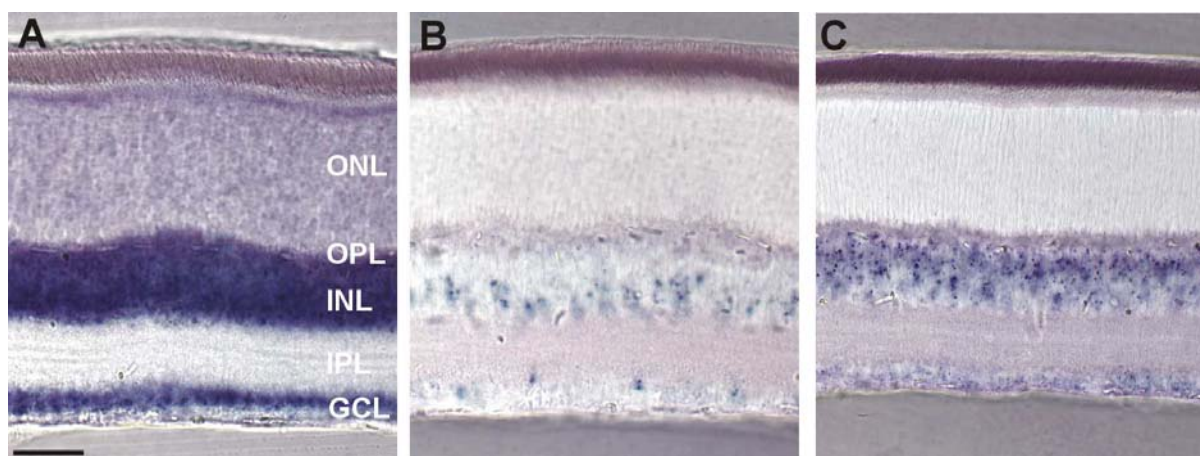


Abb. 12 : Lokalisierung der mRNA von Munc13-1 (A), Munc13-2 (B) und Munc13-3 (C) durch *In-Situ*-Hybridisierung an Ratten-Retina. Die *In-Situ*-Hybridisierung zeigt, daß Munc13-1 mRNA von allen Neuronen der Retina exprimiert wird, Munc13-2 und Munc13-3 mRNA hingegen in unterschiedlichen Zellgruppen, die jeweils komplementär zueinander sind. ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht GCL=Ganglienzellschicht; Maßstab: 50µm

Munc13-1 mRNA findet man in den Somata der Photorezeptoren in der ONL, in den Somata von Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen der INL sowie in den Somata von Ganglienzellen und Amakrinzellen in der GCL (Abb.12 A). Munc13-2 mRNA findet man in einer Subpopulation von Amakrinzellen und Bipolarzellen in der inneren INL, und in einzelnen Ganglienzellen bzw. Amakrinzellen in der GCL (Abb.12 B). Munc13-3 mRNA findet man in Bipolarzellen und einigen Amakrinzellen in der äußeren INL, und in Amakrinzellen bzw. Ganglienzellen in der GCL (Abb.12 C).

Der Vergleich der Expressionsmuster der Munc13 mRNAs in der Ratten-Retina zeigt, daß die Photorezeptoren ausschließlich Munc13-1 exprimieren, während alle anderen Neurone der

Retina Kombinationen von Munc13-1 und Munc13-2 oder Munc13-1 und Munc13-3 zu exprimieren scheinen. Die *In-Situ*-Hybridisierung wurde auch an Vertikalschnitten von Maus-Retina durchgeführt. Die Expressionsmuster der Munc13-1 und Munc13-3 mRNAs entsprechen genau denen der Ratten-Retina und sind deswegen hier nicht gezeigt. Aus technischen Gründen konnte keine spezifische Sonde für Munc13-2 in der Maus hergestellt werden. Als Positivkontrolle wurden die Sonden auf Gehirnschnitten eingesetzt. Für das Gehirn ist die Munc13-Verteilung bekannt (Augustin *et al*, 1999 a). Als Negativkontrolle wurden Sonden mit der „sense“ Sequenz der entsprechenden DNA eingesetzt.

Die *In-Situ*-Hybridisierung kann Auskunft darüber geben, in welchen Zellen die mRNA für das entsprechende Protein vorliegt. Zum Nachweis der Proteine benötigt man spezifische Antikörper. Für die hier vorgestellten Untersuchungen standen Antikörper gegen Munc13-1 und Munc13-3 zur Verfügung, die im Labor von Prof. Dr. Nils Brose (MPI für experimentelle Medizin Göttingen) hergestellt und auf ihre Spezifität getestet wurden (Betz *et al*, 1998).

3.1.2 Lichtmikroskopische Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3

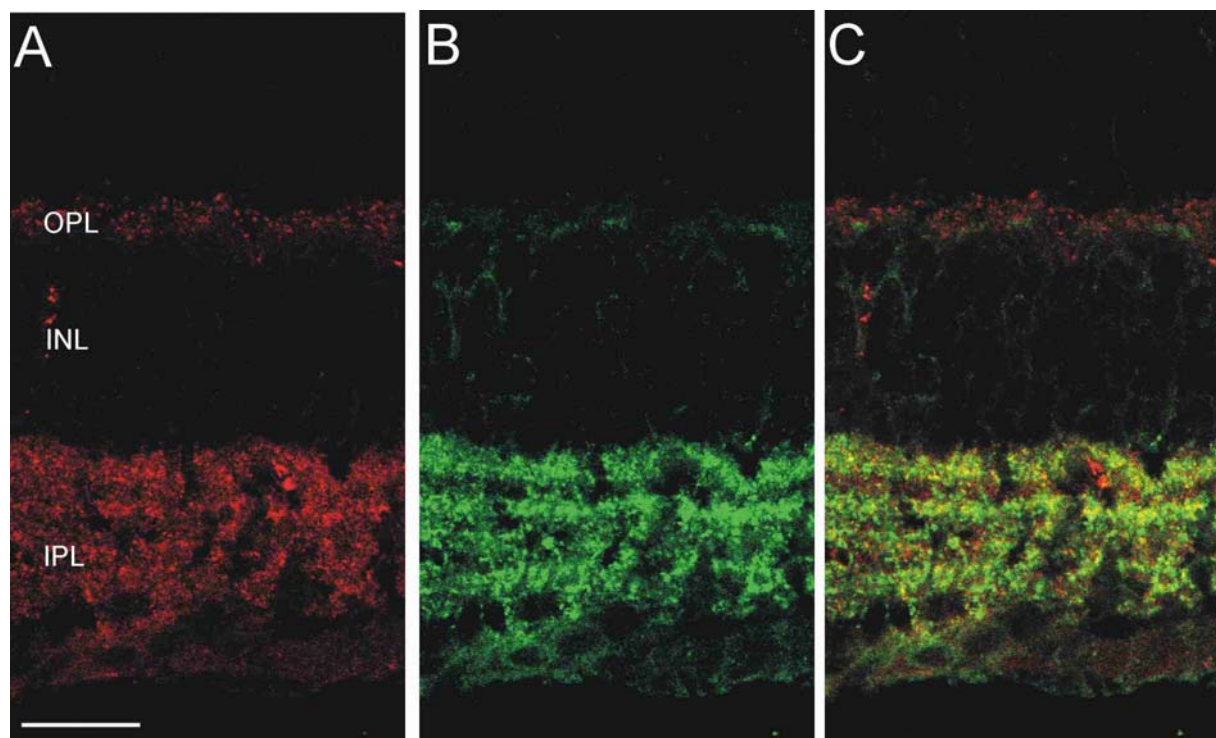


Abb. 13: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Munc13-1 und Munc13-3 an einem Vertikalschnitt der adulten Maus-Retina. Die Immunfluoreszenz von Munc13-1 und Munc13-3 zeigt eine punktierte Färbung in der OPL und in der IPL. Die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt, daß Munc13-1 und Munc13-3 in der OPL nicht kolokalisiert sind. In der IPL sind Munc13-1 und Munc13-3 teilweise kolokalisiert. A: Munc13-1 rot, B: Munc13-3 grün, C: Überlagerung Munc13-1 und Munc13-3; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht; Maßstab: 20µm

Abb.13 zeigt eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Munc13-1 und Munc13-3 auf einem vertikalen Gefrierschnitt der Maus-Retina. Die Färbung von Munc13-1

(rot) ist in der OPL und in der IPL punktiert, was auf eine synaptische Lokalisierung hinweist. Die dichte Färbung der OPL weist auf eine Lokalisierung an den Synapsen der Stäbchen-Photorezeptoren hin. In der IPL erkennt man deutlich Bänder mit stärkerer Munc13-1 Immunreaktivität, die von Bändern schwächerer Immunreaktivität getrennt sind (Abb13 A). Munc13-3 Färbung (grün) findet man ebenfalls punktiert in der OPL und IPL. Das Verteilungsmuster der Färbung in der OPL deutet auf eine Lokalisierung an den Zapfen-Photorezeptoren hin. In der IPL zeigt die Färbung von Munc13-3 ebenfalls Bänder mit starker Immunfluoreszenz, die mit Bändern schwächerer Immunfluoreszenz abwechseln. Zusätzlich findet man schwache Immunreaktivität für Munc13-3 in der INL (Abb13 B). Die Überlagerung der beiden Färbungen zeigt, daß in der OPL die Färbung von Munc13-1 intensiver und stärker punktiert ist und oberhalb der von Munc13-3 liegt: Munc13-1 und Munc13-3 sind also an den Photorezeptoren nicht kolokalisiert. In der IPL findet man Bereiche, in denen Munc13-1 und Munc13-3 kolokalisiert sind, aber auch Bereiche, in denen nur Munc13-1 oder nur Munc13-3 vorkommt (Abb.13 C).

Die Doppelfärbung von Munc13-1 mit Munc13-3 wurde zusätzlich zur Färbung von adultem Gewebe an früheren postnatalen Stadien durchgeführt. In Abbildung 14 ist die Färbung von Munc13-1 (grün) und Munc13-3 (rot) für das Stadium P8 (= **P**ostnataltag **8**) gezeigt.

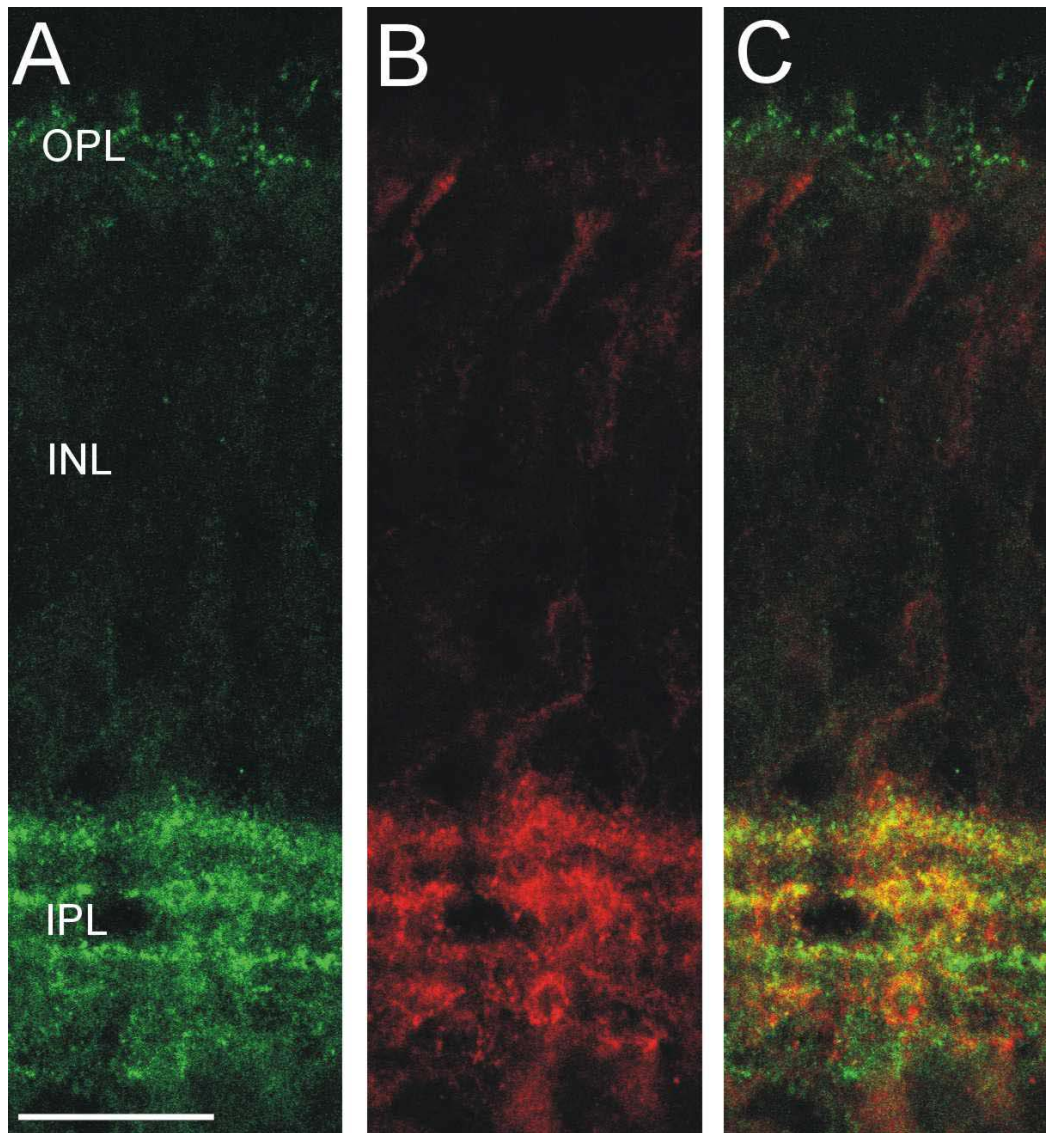


Abb. 14: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Munc13-1 und Munc 13-3 an einem Vertikalschnitt der murinen P8 Retina. Die Färbung für Munc13-1 und Munc13-3 entspricht der im adulten Gewebe, zeigt aber zusätzlich Färbung von Munc13-1 und Munc13-3 in der INL. Die Überlagerung der Färbungen zeigt eine deutliche Kolokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 in den OFF-Schichten der IPL. A: Munc13-1, B: Munc13-3 C: Überlagerung von A und B; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht ; Maßstab: 20µm

Am Zeitpunkt P8 entspricht das Färbemuster für beide Proteine jenem im adulten Gewebe. Man sieht aber in diesem Stadium Färbung für Munc13-1 (grün) und Munc13-3 (rot) in der INL, dabei ist die für Munc13-3 intensiver. Das Färbemuster der INL weist auf eine Lokalisierung der Proteine in Fortsätzen von Bipolarzellen hin. In der IPL erkennt man die Bänderung der Immunreaktivität für beide Antikörper besser als in adultem Gewebe (vgl. Abb13 und 14). In der Überlagerung sieht man deutlich eine Kolokalisierung der beiden Immunreaktivitäten in den OFF-Schichten der IPL.

In weiteren Doppelfärbungen mit Zell- und Synapsenmarkern wurde die Lokalisierung dieser beiden Proteine genauer bestimmt.

3.1.3 Zelluläre Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3

Um herauszufinden, welche Neuronen der Retina Munc13-1 und Munc13-3 exprimieren, wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen mit Markern für Stäbchenbipolarzellen, Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen in Kombination mit Munc13-1 oder Munc13-3 durchgeführt. In der OPL sind die Bipolarzelldendriten und Horizontalzellfortsätze die postsynaptischen Elemente der Photorezeptor-Bandsynapse. In der IPL bilden die Stäbchenbipolarzellen an ihren Endigungen Synapsen mit Amakrinzellen. Man kann deswegen durch Markierung dieser Zellen die — prä- oder postsynaptische — Lokalisierung von Munc13-1 oder 13-3 in Doppelfärbungen bestimmen.

3.1.3.1 Expression von Munc13-1 und Munc13-3 an Stäbchen-Bipolarzellen

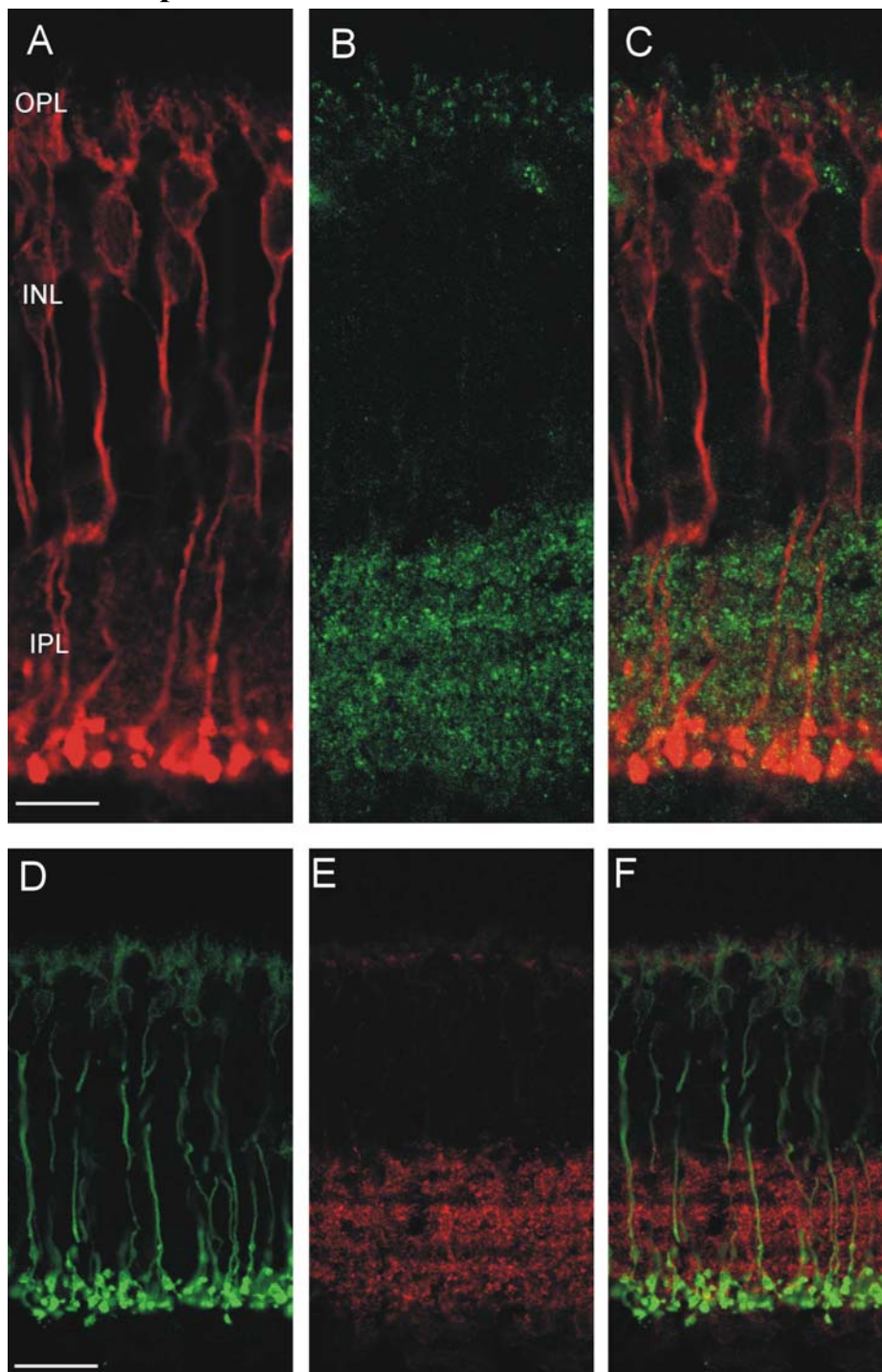


Abb.15: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung von Munc13-1/Munc13-3 mit PKC α . Die Abbildung zeigt die Färbemuster für Munc13-1/Munc13-3 und PKC α jeweils einzeln und in der Überlagerung. Die Färbung zeigt, daß Munc13-1 und Munc13-3 nicht von Stäbchen-Bipolarzellen exprimiert werden. A: PKC α , B: Munc13-1, C: Überlagerung A+B; D: PKC α , E: Munc13-3, F: Überlagerung D+E; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht; Maßstab: 20 μ m

Die Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von Munc13-1 und Munc13-3 jeweils mit PKC α sind in Abb.15 gezeigt. Der Antikörper gegen die α -Untereinheit der Proteinkinase C (PKC α)

färbt die Stäbchen-Bipolarzellen in der Retina von Mäusen (Haverkamp und Wässle, 2000). Die Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen enden in der OPL, wo sie in die Terminalien der Stäbchen invaginieren. Die Zellkörper der Stäbchen-Bipolarzellen liegen in zwei Reihen in der INL, unterhalb der OPL. Die Axon-Terminalien enden tief in der IPL nahe der Ganglienzellschicht. (Abb.15 A+D). Die Überlagerung der Färbungen für Munc13-1 und PKC α zeigt, daß die Munc13-1 Färbung (grün) in der OPL den Dendriten der Stäbchen-Bipolarzellen (rot) aufsitzt und nicht in den Dendriten vorliegt. Die Immunreaktivität von Munc13-1 ist in der ganzen IPL verteilt, scheint aber nicht mit Bipolarzell-Terminalien kolokalisiert zu sein (Abb.15 C).

Die Überlagerung der Färbungen für Munc13-3 und PKC α zeigt ebenfalls eine klare räumliche Trennung von Munc13-3 und Stäbchen-Bipolarzellen in der OPL und keine Kolokalisierung der beiden Färbungen in den Terminalien der Stäbchen-Bipolarzellen in der IPL.

3.1.3.2 Expression von Munc13-1 in Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen

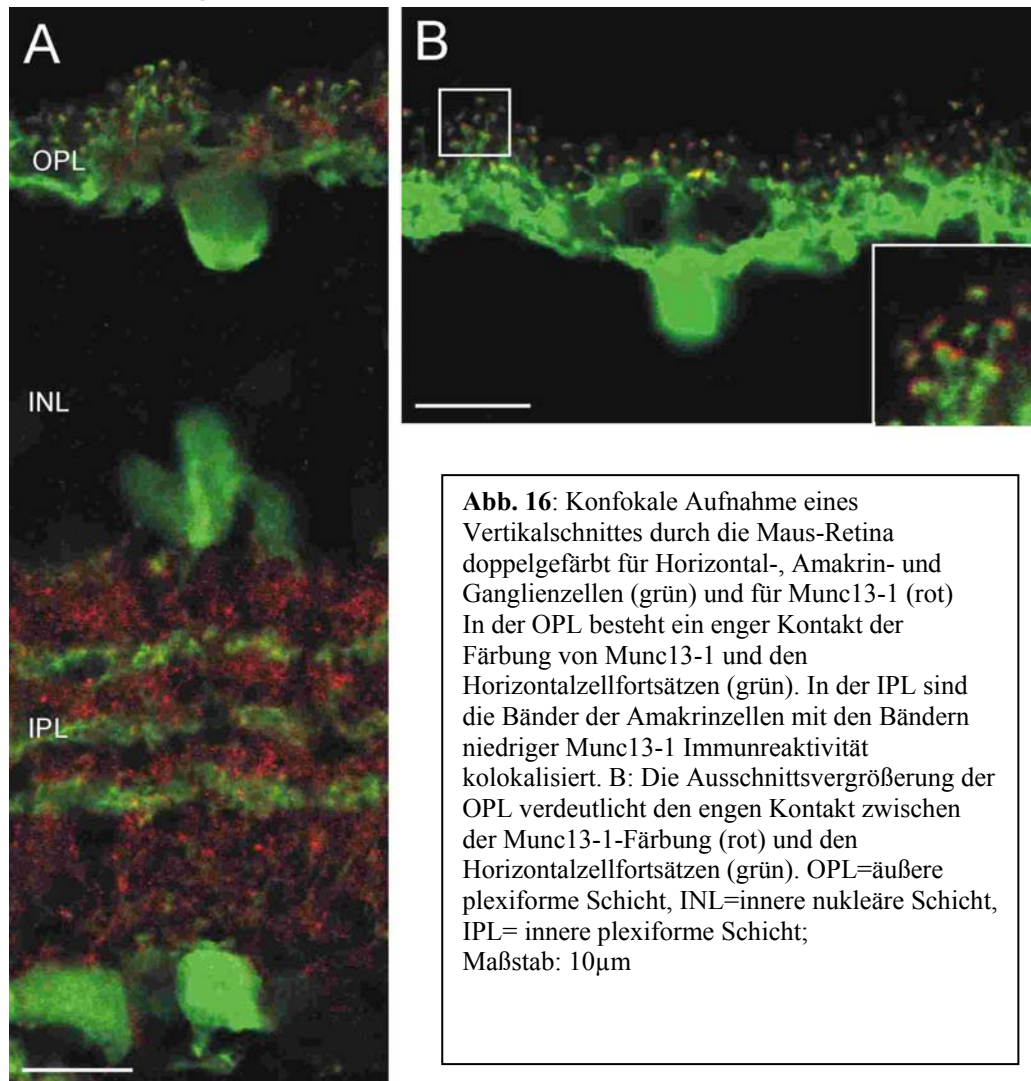


Abbildung 16 zeigt eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung an Vertikalschnitten von Maus-Retina mit Antikörpern gegen Munc13-1 und das Kalzium-bindende Protein Calbindin (α -Calbindin). α -Calbindin färbt selektiv Horizontalzellen, cholinerge Amakrinzellen und Ganglienzellen. Die Fortsätze der Amakrinzellen stratifizieren in drei Bändern in der IPL, wobei das innerste und das äußerste Band von den cholinergen Amakrinzellen gebildet werden (Gabriel und Witkovsky, 1998).

In der OPL findet man die Färbung von Munc13-1 (rot) in engem Kontakt mit den Fortsätzen der Horizontalzellen (grün). Die Ausschnittsvergrößerung zeigt, daß die Munc13-1-Färbung hufeisenförmig den Horizontalzellfortsätzen aufsitzt (Abb 16 B).

In der IPL fällt auf, daß die Bänder der calbindin-positiven Amakrinzellen mit den Bändern niedriger Munc13-1 Immunreaktivität zusammenfallen (Abb.16 A).

3.1.4 Lokalisierung von Munc13-1/Munc13-3 an der Photorezeptor-Band-Synapse

Als nächstes wurde die Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an den Photorezeptor-Synapsen in der OPL genauer bestimmt. Dazu wurden für Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen die Antikörper gegen Munc13-1 oder Munc13-3 mit solchen kombiniert, die die Prä- oder die Postsynapse markieren.

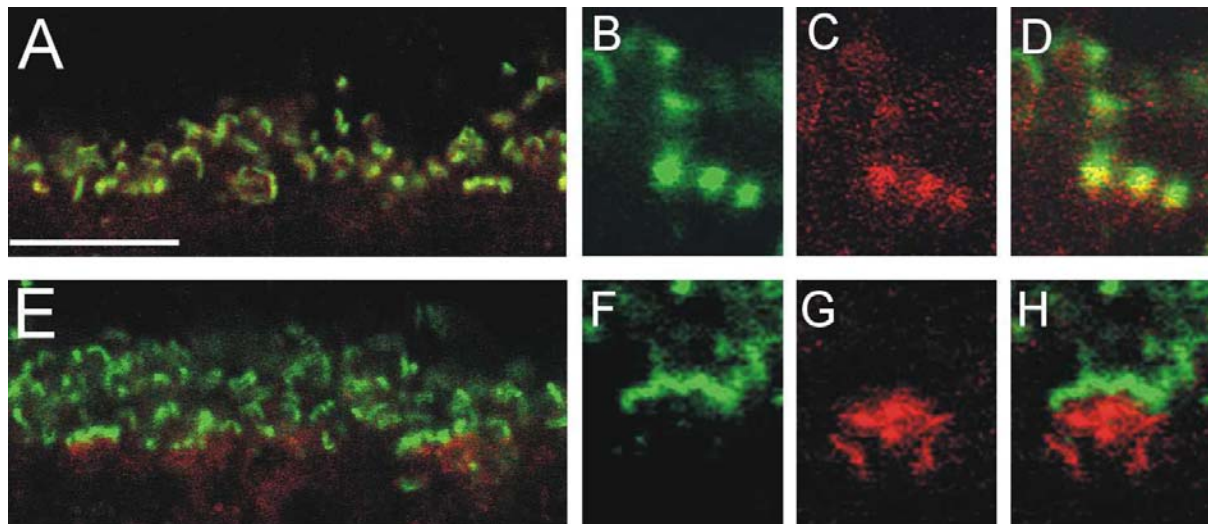


Abb. 17: Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an der Photorezeptor-Band-Synapse.

Konfokale Aufnahmen der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen Piccolo und Munc13-1/Munc13-3. Die Doppelfärbung von Munc13-1 mit Piccolo zeigt eine präsynaptische Kolo-kalisierung der beiden Proteine. Die Doppelfärbung von Munc13-3 mit Piccolo zeigt durch „nicht-Kolo-kalisierung“ der Proteine eine eindeutig postsynaptische Lokalisierung von Munc13-3.

A: Munc13-1+ Piccolo Doppelfärbung, Ausschnitt der OPL; B: Vergrößerung eines Zapfenterminals mit Färbung von Piccolo; C: Vergrößerung desselben Zapfenterminals mit Färbung von Munc13-1; D: Überlagerung von B und C; E: Munc13-3 + Piccolo Doppelfärbung, Ausschnitt der OPL; F: Vergrößerung eines Zapfenterminals mit Färbung von Piccolo; G: Vergrößerung desselben Zapfenterminals mit Färbung von Munc13-3; H: Überlagerung von F und G; Maßstab: 10µm

Zur Analyse der Präsynapse wurde mit einem Antikörper gegen das präsynaptische Zytomatrixprotein Piccolo (Cases-Langhoff *et al*, 1996) und mit Antikörpern gegen Munc13-1 und Munc13-3 immunfluoreszenz-doppelgefärbt (Abb.17). Der Antikörper gegen Piccolo wurde hier als Marker für das Präsynaptische Band der Photorezeptoren eingesetzt (Dick *et al*, 2001). Die Doppelfärbung von Piccolo und Munc13-1 zeigt, daß Piccolo (grün) und Munc13-1 (rot) präsynaptisch an den Photorezeptor-Synapsen kolo-kalisiert sind (Abb.17 D). Die Doppelfärbung von Piccolo (grün) und Munc13-3 (rot) zeigt, daß diese beiden Proteine nicht kolo-kalisiert sind: Piccolo liegt präsynaptisch und Munc13-3 postsynaptisch an den Photorezeptorsynapsen vor (Abb.17 H).

Zur Analyse der Postsynapse wurde in Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen ein Antikörper gegen das postsynaptische Protein ProSAP1 (Boeckers *et al*, 1999; Kreienkamp *et al*, 2000) mit den Antikörpern gegen Munc13-1 oder Munc13-3 kombiniert. In Abb.18 sind die Ergebnisse dieser Färbungen dargestellt.

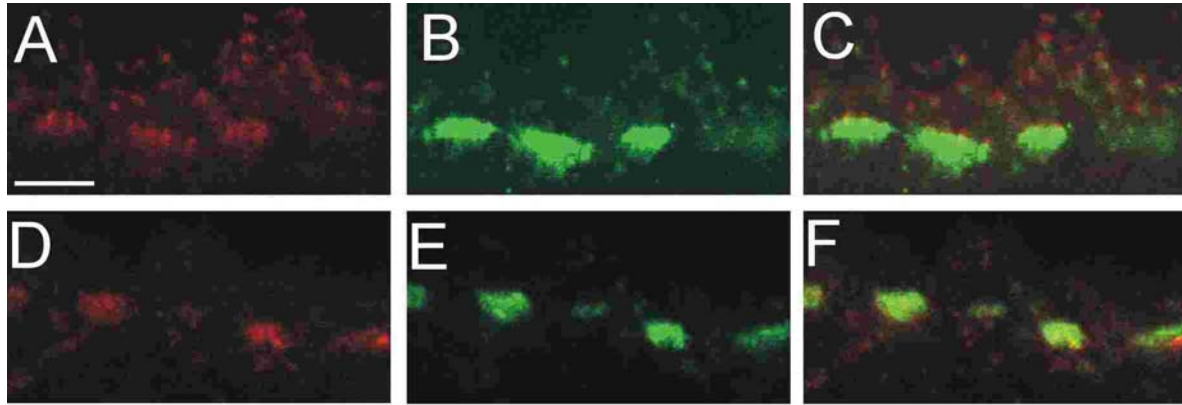


Abb. 18: Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an der Photorezeptor-Band-Synapse. Konfokale Aufnahmen der Doppelfärbung mit Antikörpern gegen ProSAP1 und Munc13-1/Munc13-3. Die Doppelfärbung zeigt, daß Munc13-1 nicht mit ProSAP1 an der Postsynapse kolokalisiert ist, wohingegen die Doppelfärbung mit Munc13-3 eine eindeutige Kolokalisierung zeigt. A: Ausschnitt der OPL mit Färbung von Munc13-1; B: Ausschnitt der OPL mit Färbung von ProSAP1; C Überlagerung von A+B D: Ausschnitt der OPL mit Färbung von Munc13-3; E: Ausschnitt der OPL mit Färbung von ProSAP1; F: Überlagerung D+E; Maßstab: 5µm

Die Doppelfärbungen zeigen keine Kolokalisierung von Munc13-1 und ProSAP1 (Abb.18A-C), aber eine eindeutige Kolokalisierung von Munc13-3 und ProSAP1 (Abb.18D-F).

Aus den Ergebnissen dieser Doppelfärbungen kann geschlossen werden, daß Munc13-1 präsynaptisch und Munc13-3 postsynaptisch an der Photorezeptorsynapse lokalisiert ist.

3.1.5 Synaptische Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 in der IPL

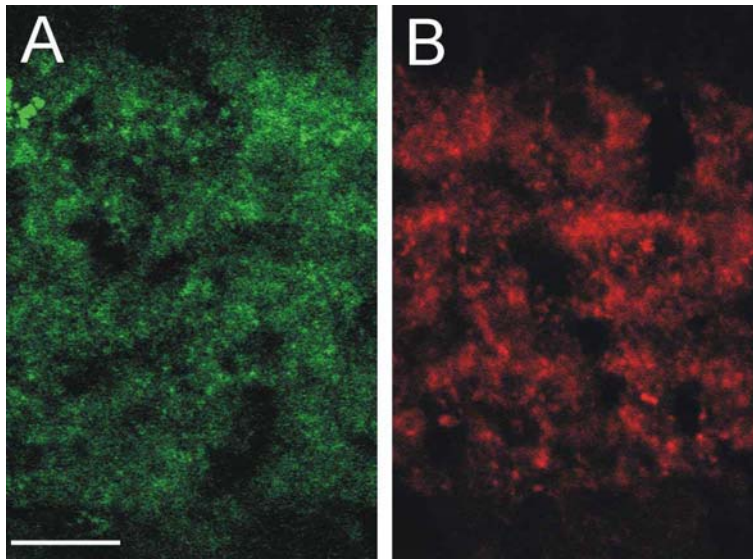


Abb. 19: Ausschnitt der IPL; Konfokale Aufnahme von einem Vertikalschnitt der Maus-Retina immunfluoreszenzgefärbt für Munc13-1 (A) und Munc13-3 (B). Maßstab: 10µm

Aufgrund der hohen Dichte an immunfluoreszierenden Punkten für Munc13-1 und Munc13-3 in der IPL, konnte die prä- und postsynaptische Lokalisierung der Munc13-Proteine nicht lichtmikroskopisch mit Doppelfärbungen bestimmt werden (Abb.19). Um diese Frage zu klären, wurde die Lokalisierung der Proteine mit Hilfe der Immuno-Elektronenmikroskopie untersucht.

3.1.6 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an den Synapsen in der OPL und IPL

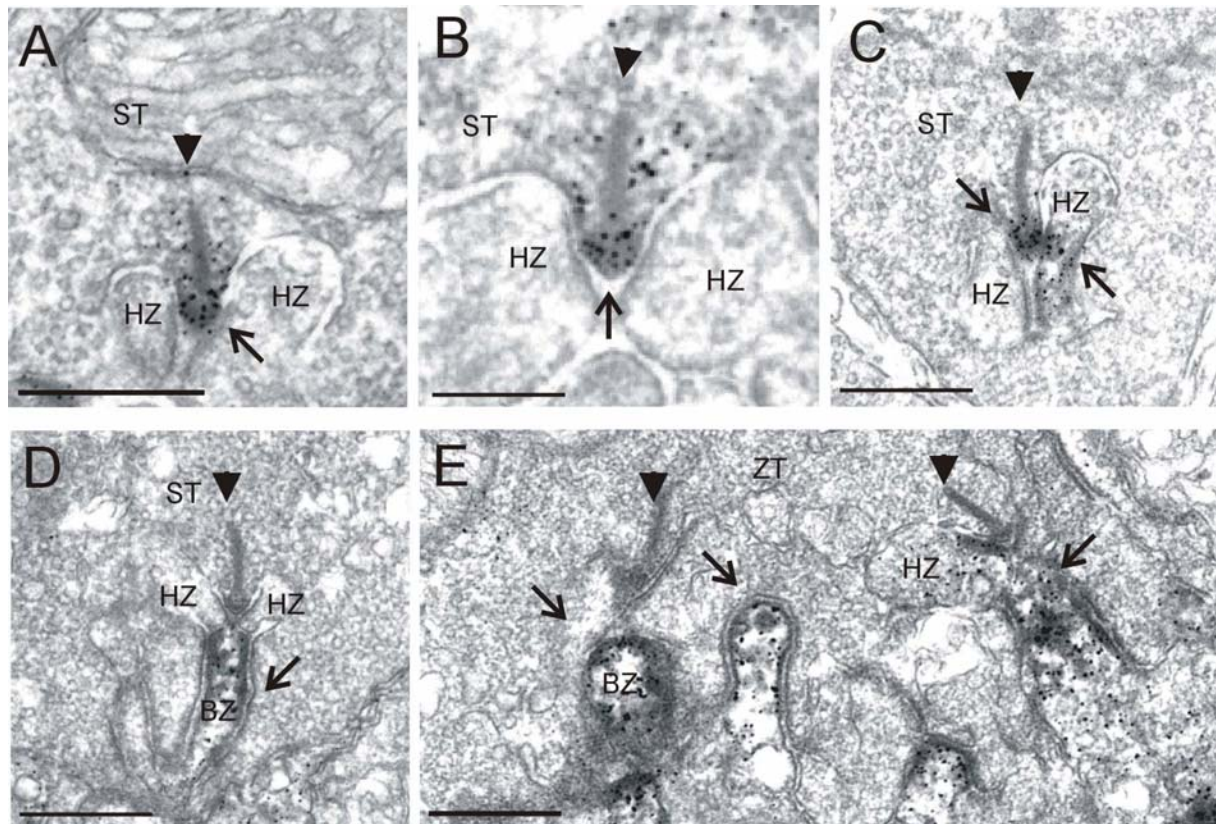


Abb. 20 Elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an den Photorezeptor-Synapsen in der OPL. Munc13-1 ist präsynaptisch am synaptischen Band der Photorezeptor-Terminalien lokalisiert, wohingegen Munc13-3 postsynaptisch in den Fortsätzen von Bipolarzellen und Horizontalzellen zu finden ist. Zusätzlich zur präsynaptischen Lokalisierung von Munc13-1 findet man das Protein auch postsynaptisch in Fortsätzen von Horizontal- und Bipolarzellen. A+B: Photorezeptor-Stäbchen-Terminal mit Färbung von Munc13-1 an der Basis des synaptischen Bandes. C: Photorezeptor-Stäbchen-Terminal mit Färbung von Munc13-1 an der Basis des synaptischen Bandes und im Horizontalzellfortsatz. D: Photorezeptor-Stäbchen-Terminal mit Färbung von Munc13-3 im Bipolarzellfortsatz. E: Photorezeptor-Zapfen-Terminal mit Färbung für Munc13-3 in Bipolarzell- und Horizontalzell-Fortsätzen. HZ=Horizontalzelle, BZ=Bipolarzelle, GZ=Ganglienzelle, ZT=Zapfenterminal, ST= Stäbchenterminal, die Pfeile markieren die Färbung für Munc13-1 und Munc13-3, die Pfeilspitzen markieren das synaptische Band. Maßstab: 0,5 µm

Abbildung 20 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Photorezeptor-Band-Synapsen in der OPL mit Immunfärbung für Munc13-1 und Munc13-3. Färbung für Munc13-1 findet man präsynaptisch an der Basis des synaptischen Bandes in den Terminalien der Photorezeptoren (Abb.20 A und B) und postsynaptisch in den Fortsätzen von Bipolarzellen und Horizontalzellen (Abb.20 C). Färbung für Munc13-3 findet man an den Photorezeptor-Terminalien ausschliesslich postsynaptisch in den Fortsätzen von Bipolarzellen und Horizontalzellen (Abb.20 D und E).

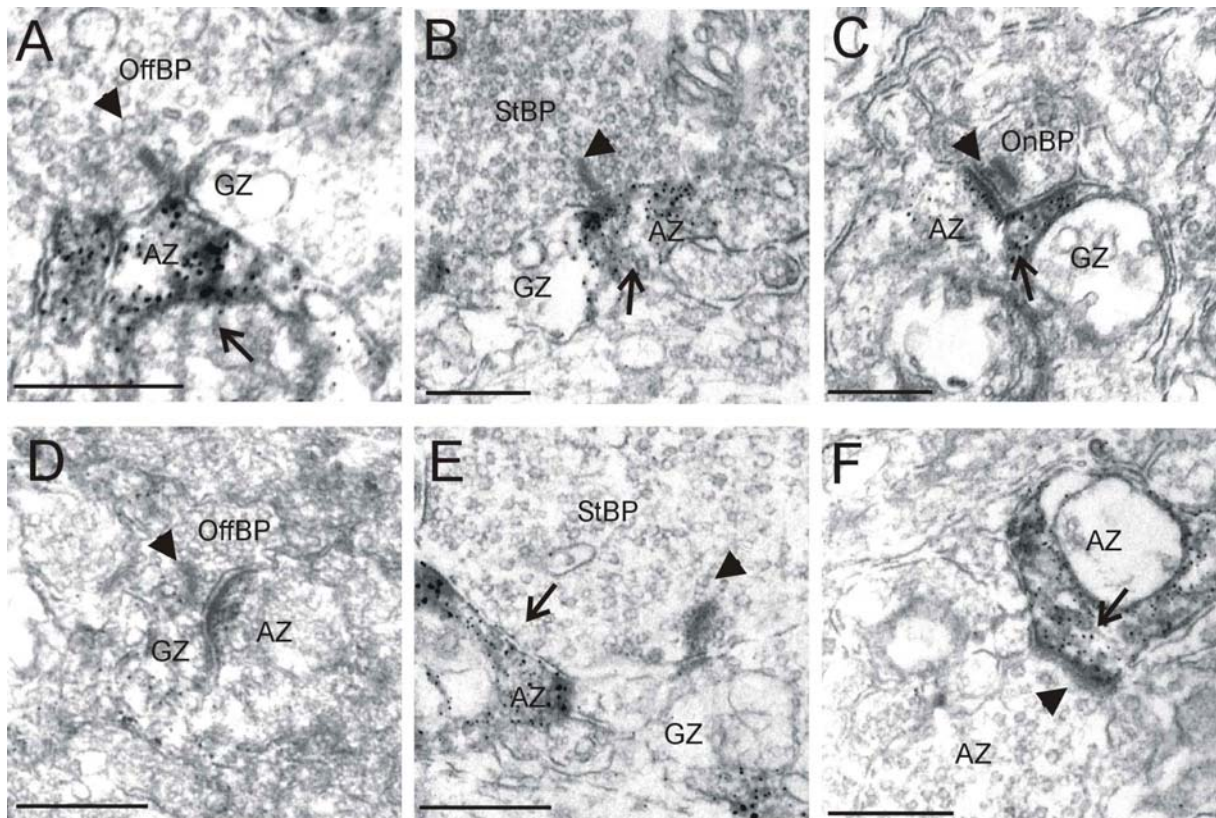


Abb. 21 Lokalisierung von Munc13-1 und Munc13-3 an den Synapsen der IPL. A-C. Färbung für Munc13-1 in Fortsätzen von Amakrinzellen postsynaptisch zu den Bandsynapsen von Off-, On- und Stäbchen-Bipolarzellen. D+E: Färbung für Munc13-3 in Fortsätzen von Amakrinzellen postsynaptisch zu den Bandsynapsen von Off- und Stäbchen-Bipolarzellen F: Färbung für Munc13-3 an einer konventionellen Amakrinzellsynapse. Pfeile markieren die Färbung, Pfeilspitzen markieren das synaptische Band. AZ=Amakrinzelle, OffBP=Off-Bipolarzelle, OnBP= On-Bipolarzelle, StBP= Stäbchen-Bipolarzelle
Maßstab: 0,5µm

Die immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß Munc13-1 und Munc13-3 nicht präsynaptisch an den Bandsynapsen der Bipolarzellen in der IPL vorkommen. Man findet Färbung in allen funktionalen Unterschichten der IPL: Off- und On-Schicht, postsynaptisch an Zapfen- und Stäbchen-Bipolarzell-Synapsen (Abb.21 A-E). Man findet beide Proteine präsynaptisch an konventionellen Amakrinzell-Synapsen (Abb.21 F).

3.2 Untersuchungen zur Funktion von Munc13-2 und Munc13-3 in der Retina

Nach der Untersuchung der zellulären und synaptischen Verteilung der Munc13-Proteine in wildtypischer Maus-Retina wurde die mögliche Funktion der Munc13-Proteine untersucht. Dazu wurden immunzytochemische Experimente und Ableitungen von ERGs an den Retinae von Munc13-2 und Munc13-3 knock-out-Mäusen durchgeführt.

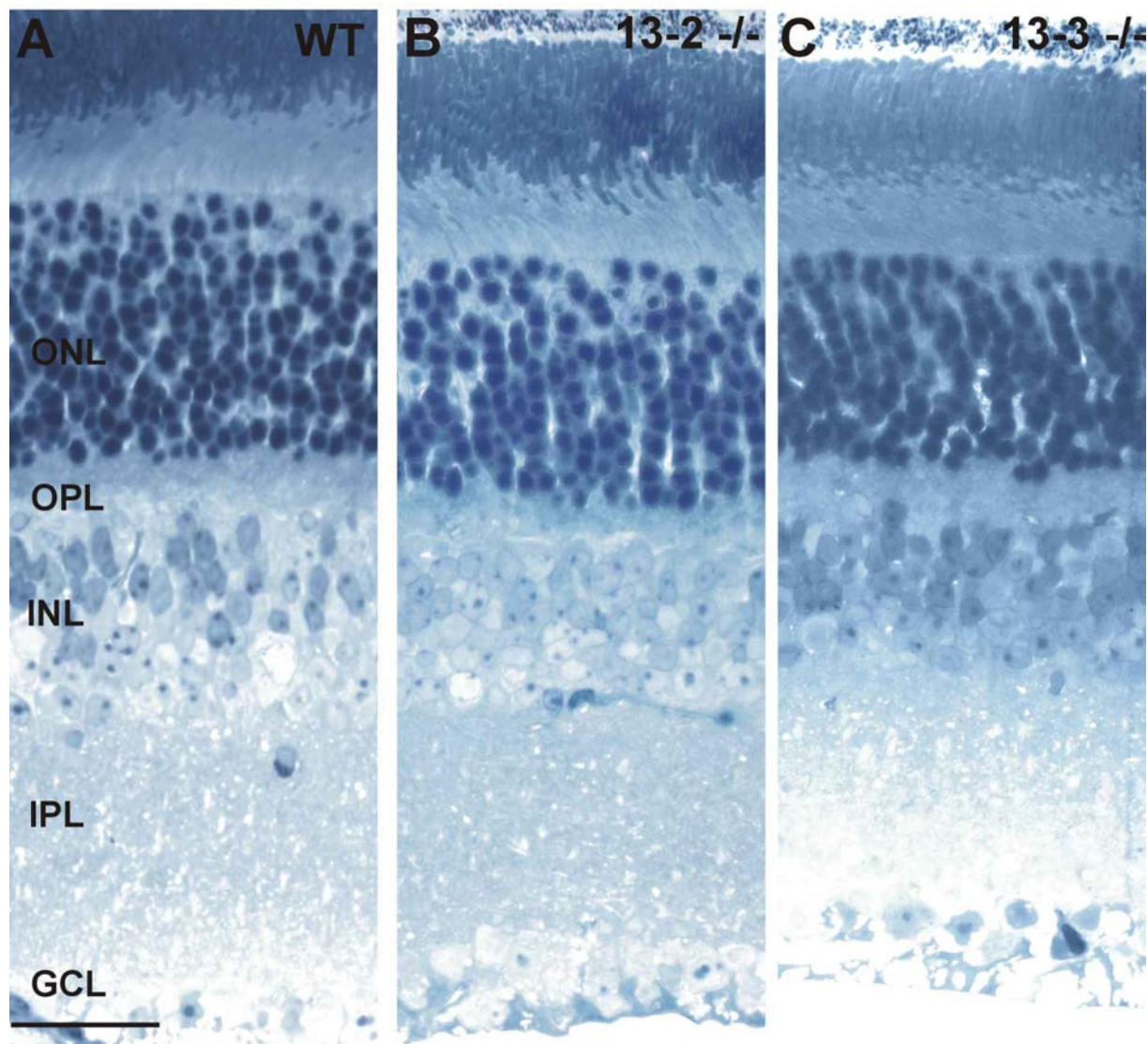


Abb. 22: Mit Toluidinblau gefärbte Semidünnschnitte von wt-(A), Munc13-2-ko (B) und Munc13-3-ko-Retinae (C). Es gibt keinen Unterschied in der Anatomie zwischen wt- und ko-Retina. ONL=äußere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL=innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, Maßstab: 25µm

Es wurden vertikale Semidünnschnitte von den Retinae der wt-, Munc13-2-ko und Munc13-3-ko Mäuse hergestellt, die mit Toluidinblau gefärbt wurden. Der Vergleich der wt-Retina mit den Munc13-2 und Munc13-3 ko-Retinae zeigte keine morphologischen Unterschiede: Auch in den ko-Retinae bilden sich die verschiedenen nukleären und plexiformen Schichten völlig normal aus (Abb. 22).

3.2.1 Immunzytochemische Analyse der Munc13-2 und Munc13-3-knock-out-Retinae

Als nächstes wurde der zelluläre und synaptische Phänotyp der Munc13-2- und Munc13-3-defizienten Retinae lichtmikroskopisch untersucht. Dazu wurden Antikörper eingesetzt, die verschiedene Zell- und Synapsentypen der Retina markieren.

3.2.1.1 Die Neurone der Munc13-2 und Munc13-3-ko Retina sind unverändert

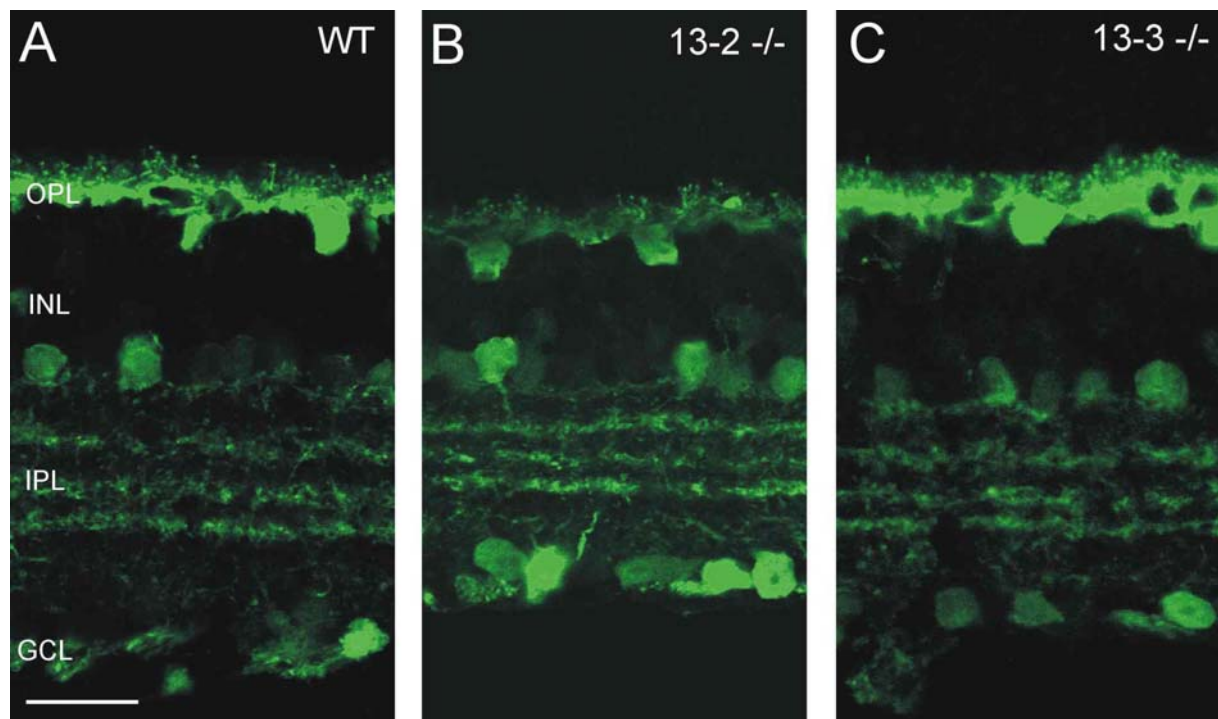


Abb. 23: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Färbung von Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen mit einem Antikörper gegen Calbindin am Vertikalschnitt von Maus-Retina. Die Aufnahmen zeigen, daß diese Zelltypen in der Munc13-2- und Munc13-3-ko-Retina normal ausgebildet werden. A: wt-Retina B: Munc13-2-ko-Retina, C: Munc13-3-ko-Retina; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL=innere plexiforme Schicht GCL=Ganglienzellschicht; Maßstab 20µm

Der Antikörper gegen das kalziumbindende Protein Calbindin färbt in der Retina die Somata der Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen, sowie die Fortsätze der Horizontalzellen in der OPL und die stratifzierten Fortsätze der Amakrinzellen in der IPL (Gabriel und Witkovsky, 1998). Die Retinae von wt, Munc13-2-ko und Munc13-3-ko zeigen keine Unterschiede (Abb.23).

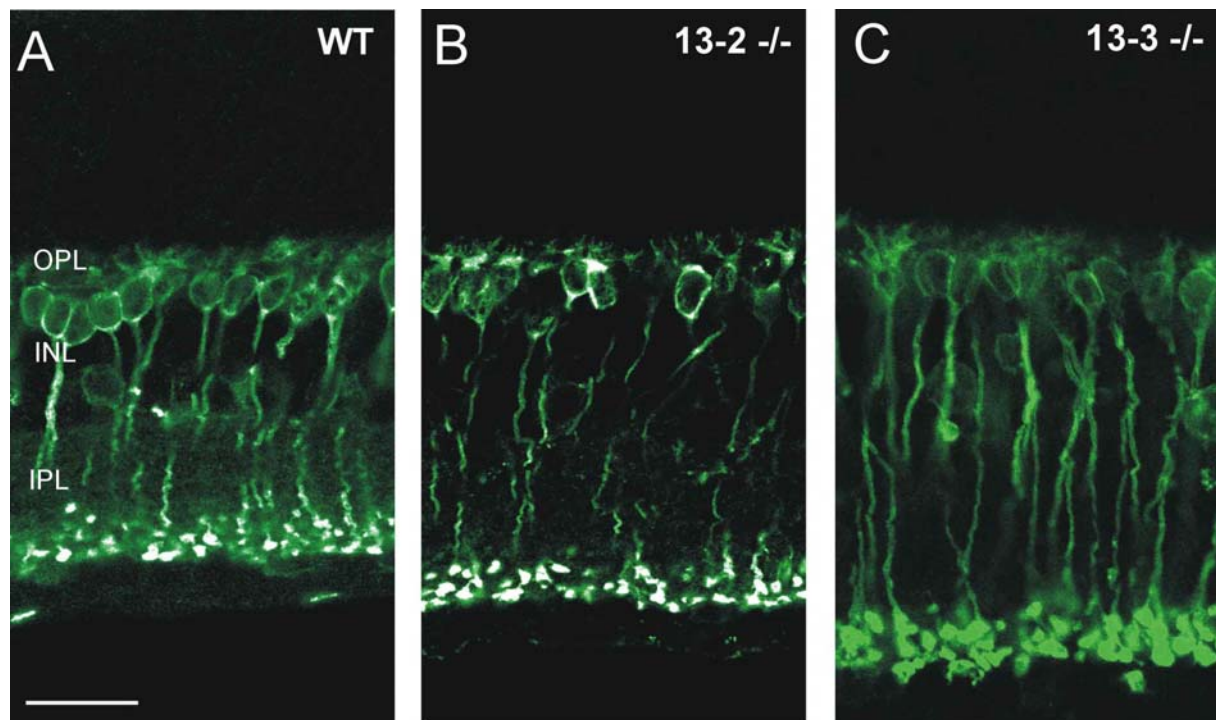


Abb. 24: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Färbung von Stäbchen-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen PKC α am Vertikalschnitt von Maus-Retina. Zwischen wt (A), Munc13-2-ko (B) und Munc13-3-ko (C) zeigen sich keine Unterschiede in der Ausbildung der Stäbchen-Bipolarzellen. OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht GCL=Ganglienzellschicht; Maßstab 20 μ m

Abbildung 24 zeigt die Immunfluoreszenzfärbungen der Retinae von wt, Munc13-2-ko und Munc13-3-ko mit einem Antikörper gegen PKC α , der die Stäbchen-Bipolarzellen markiert. Wie für die Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen, findet man in der Ausbildung der Stäbchen-Bipolarzellen keinen Unterschied zwischen wt- und ko-Retinae. Es wurden zusätzlich verschiedene andere Antikörper als Zellmarker eingesetzt, bei denen ebenfalls kein Unterschied zwischen wt- und ko-Retinae gefunden wurde: Zapfen-On-Bipolarzellen (G0 α , Vardi *et al*, 1993; Vardi 1998), Off-Bipolarzellen (NK3R=Neurokinin3, Ding *et al*, 1996) und Müller-Gliazellen (Glutaminsynthetase, Haverkamp und Wässle, 2000).

3.2.1.2 Analyse der Synapsen in den Munc13-2 und Munc13-3-ko-Retinae

Zur Untersuchung der Synapsen wurden verschiedene Synapsenmarker für das exzitatorische und inhibitorische System eingesetzt.

Mit einem Antikörper gegen den vesikulären Glutamat-Transporter I (Vglut1; Takamori *et al*, 2000) kann man alle glutamatergen Synapsen der Retina markieren: die Photorezeptor-Band-Synapsen in der OPL und die Bipolarzell-Bandsynapsen in der IPL (Haverkamp *et al*, 2003). Es gibt keinen Unterschied in der Dichte und Verteilung der glutamatergen Synapsen zwischen wt-, Munc13-2- und Munc13-3-ko Retina (Abb. 25).

In Abbildung 26 ist die Immunfluoreszenz-Färbung des Zytomatrixproteins gezeigt (tom Dieck *et al*, 1998). Der Antikörper wurde als Marker für die Photorezeptor-Band-Synapsen der OPL und für die konventionellen Synapsen der IPL eingesetzt (Dick *et al*, 2001, Brandstätter *et al*, 1999).

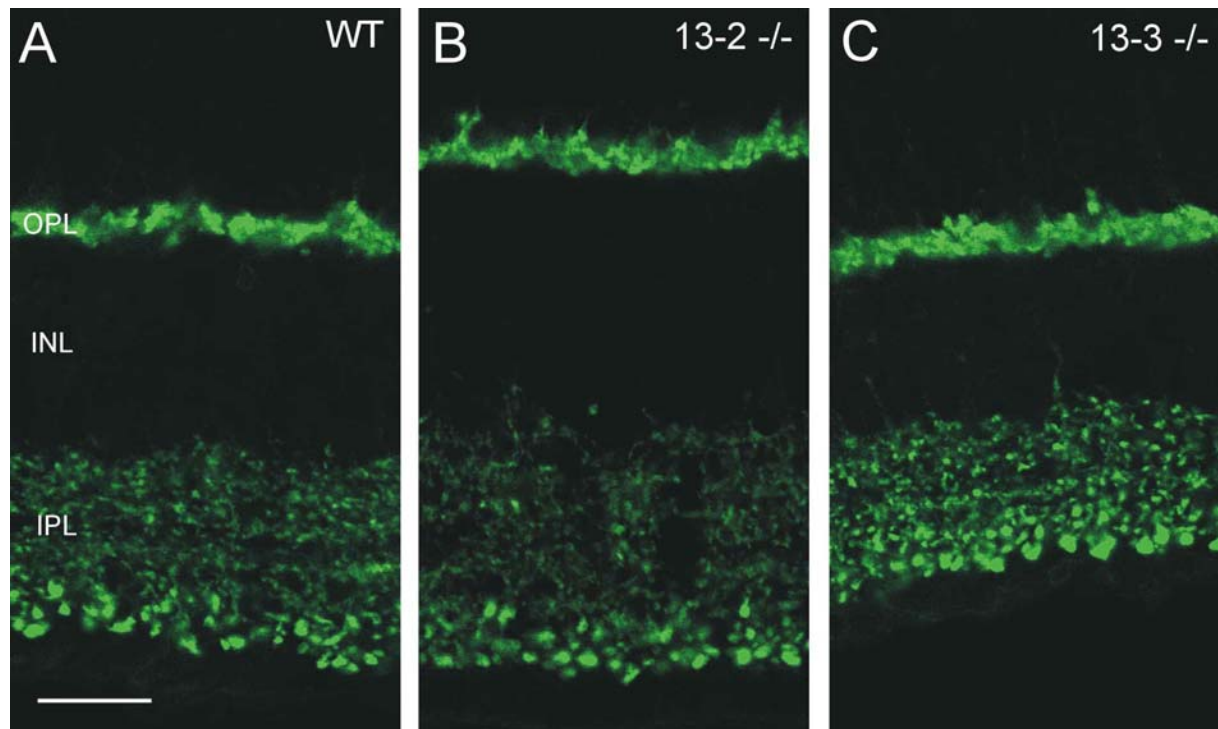


Abb. 25: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen VGLUT1. Die Abbildung zeigt keine Unterschiede in der Expression glutamaterger Synapsen zwischen wt (A), Munc13-2 ko (B) und 13-3 ko Retinae (C): zeigt die periphere Retina, die insgesamt dünner ist, als die zentrale Retina; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht; Maßstab 20µm

Auch in der Expression von Bassoon zeigt sich kein Unterschied zwischen wt- und Munc13-2- bzw. Munc13-3-ko-Retina (Abb. 26). Als Marker aller chemischen Synapsen der Retina wurde ein Antikörper gegen das Vesikelprotein Synaptophysin eingesetzt (Brandstätter *et al*, 1996 b). Auch bei dieser Färbung wurde kein Unterschied gefunden (nicht abgebildet).

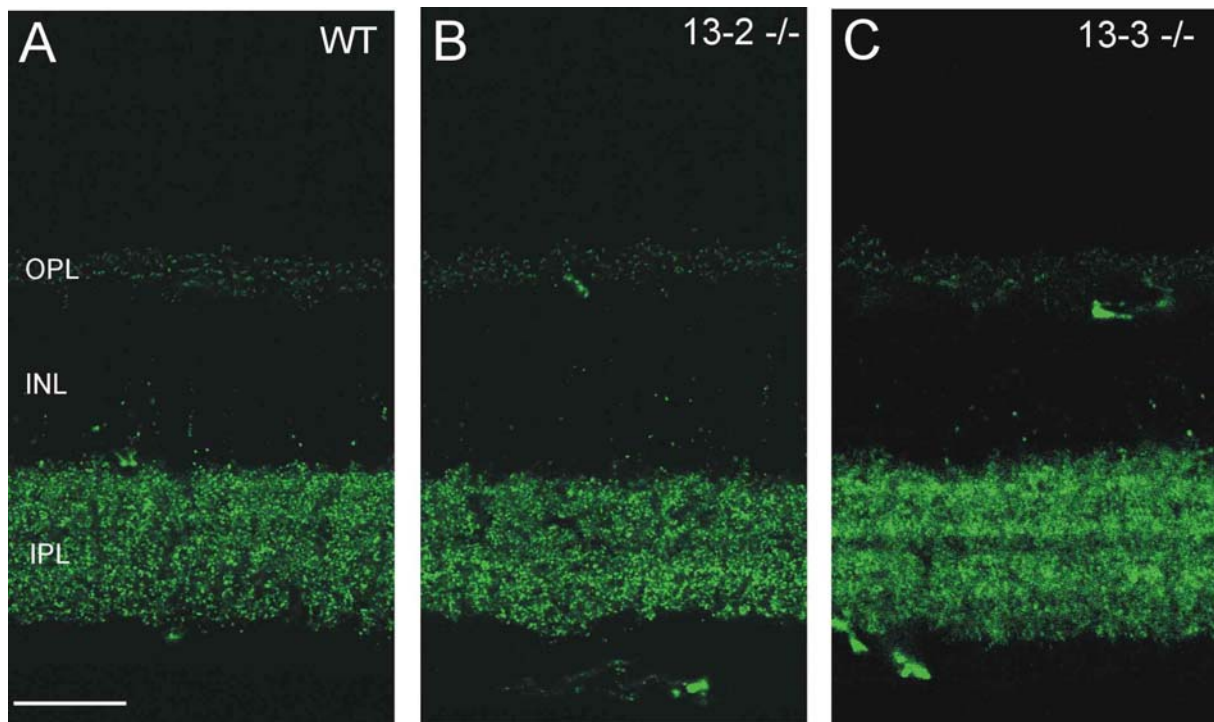


Abb. 26: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen Bassoon. Die Färbung zeigt keinen Unterschied in der Immunreaktivität in der OPL und IPL von wt (A), Munc13-2-ko (B); und Munc13-3-ko (C); OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht; Maßstab 20µm

Das inhibitorische System der Retina besteht vorwiegend aus den GABAergen und glyzinergen Amakrinzellen, deren konventionellen chemischen Synapsen in der IPL, sowie den Horizontalzellen mit ihren Synapsen in der OPL (Wässle und Boycott, 1991). Um die Ausbildung der inhibitorischen Synapsen in den Munc13-2 bzw Munc13-3-ko-Retinae genauer zu untersuchen, wurden Antikörper gegen einen spezifischen Typ von GABAergen Synapsen, und gegen alle inhibitorischen Synapsen der Retina eingesetzt. Ein Antikörper gegen die ρ -Untereinheit des GABA_C-Rezeptors färbt die Postsynapse von GABAergen Synapsen in der OPL und in der IPL (Enz *et al*, 1996). Der Vergleich der Färbung zwischen wt und Munc13-2 und Munc13-3-ko- Retina zeigt keinen Unterschied (Abb. 27).

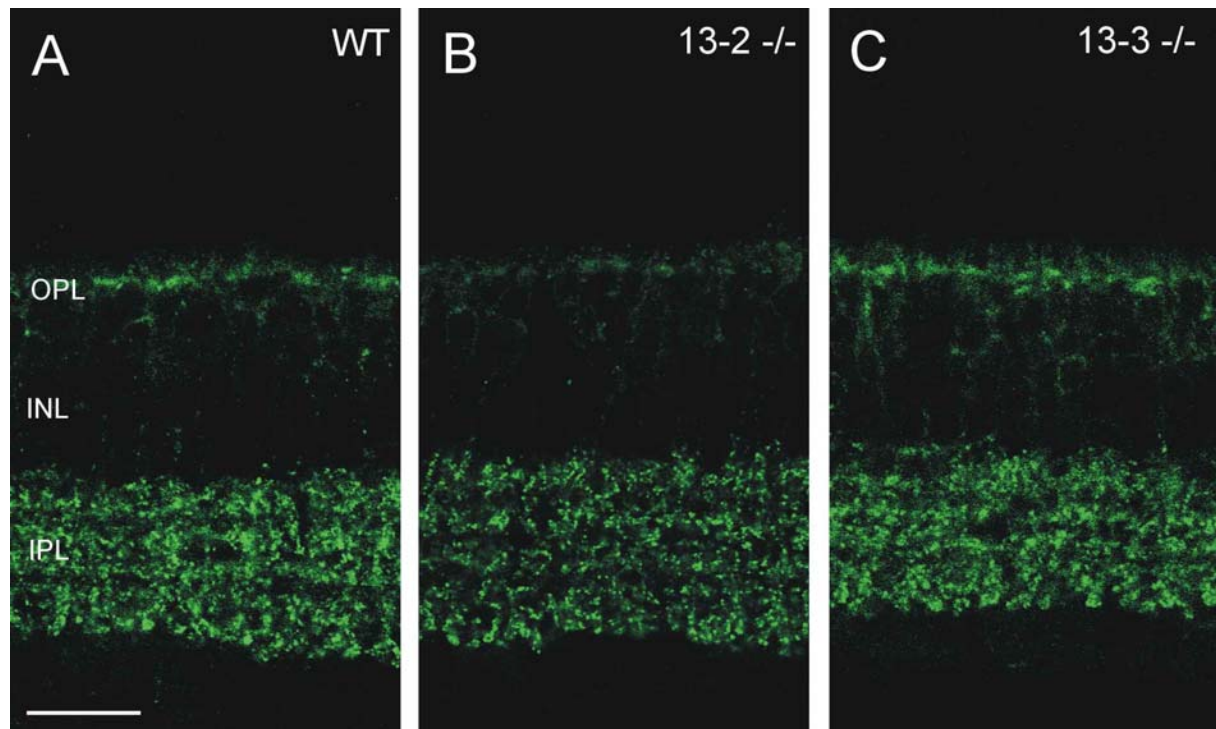


Abb. 27: Konfokale Aufnahme der Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen GABA_cR. Die Expression von GABA_c-Rezeptoren in der Retina ist von Munc13-2 und Munc13-3 unabhängig. A: WT, B: Munc13-2 KO, C: 13-3 KO; OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht; Maßstab 20µm

Das Gleiche gilt für die Färbung mit dem Antikörper gegen den vesikulären inhibitorischen Aminosäure-Transporter (VIAAT; nicht abgebildet), der alle glyzinergen und GABAergen Synapsen in der Retina markiert (McIntire *et al* 1997, Sagne *et al*, 1997).

Die Morphologie der Synapsen in den Munc13-2 und Munc13-3-ko Retinae wurde auch ultrastrukturell untersucht (Abb.28.).

3.2.1.3 Ultrastrukturelle Analyse der Synapsen von Munc13-2 und Munc13-3 Knock-out-Retinae

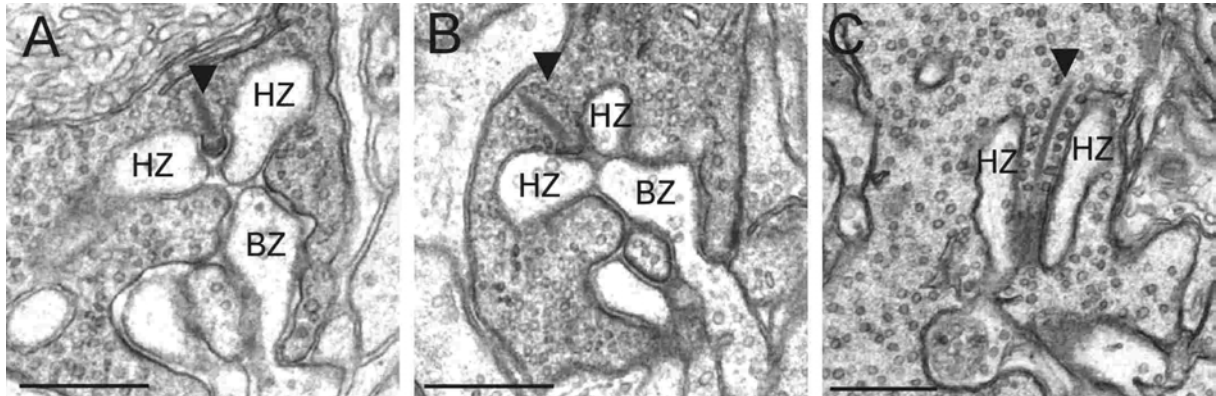


Abb. 28: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Stäbchen-Bandsynapsen. Es gibt keinen Unterschied in der Ausbildung der Synapsen zwischen wt (A), Munc13-2-ko (B) und Munc13-3-ko (C). Die postsynaptischen Elemente der Horizontal- und Stäbchenbipolarzellen invaginieren in das synaptische Terminal, und das präsynaptische Band ist an der aktiven Zone verankert (Pfeil). BZ=Bipolarzelle, HZ=Horizontalzelle
Maßstab: 0,5µm

Abbildung 28 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Photorezeptor-Synapsen in den wt-, Munc13-2-ko und Munc13-3-ko-Retinae: Die für die Photorezeptor-Synapsen typische Triadenstruktur, gebildet vom synaptischen Band an der Präsynapse und den invaginierenden postsynaptischen Elementen von Horizontal- und Bipolarzellen, ist in den Munc13-ko-Retinae normal ausgebildet, wie der Vergleich mit der wildtypischen Synapse zeigt.

In Abbildung 29 (nächste Seite) sind Beispiele elektronenmikroskopischer Aufnahmen von den Bandsynapsen der Bipolarzellen und konventionellen Amakrinzell-Synapsen in der IPL von wt-, Munc13-2 und Munc13-3-ko Retina gezeigt. Der Vergleich der Synapsen in der IPL zwischen wt-Retina und Munc13-2 bzw. Munc13-3-ko-Retina zeigt keinen Unterschied in der Ultrastruktur der Synapsen.

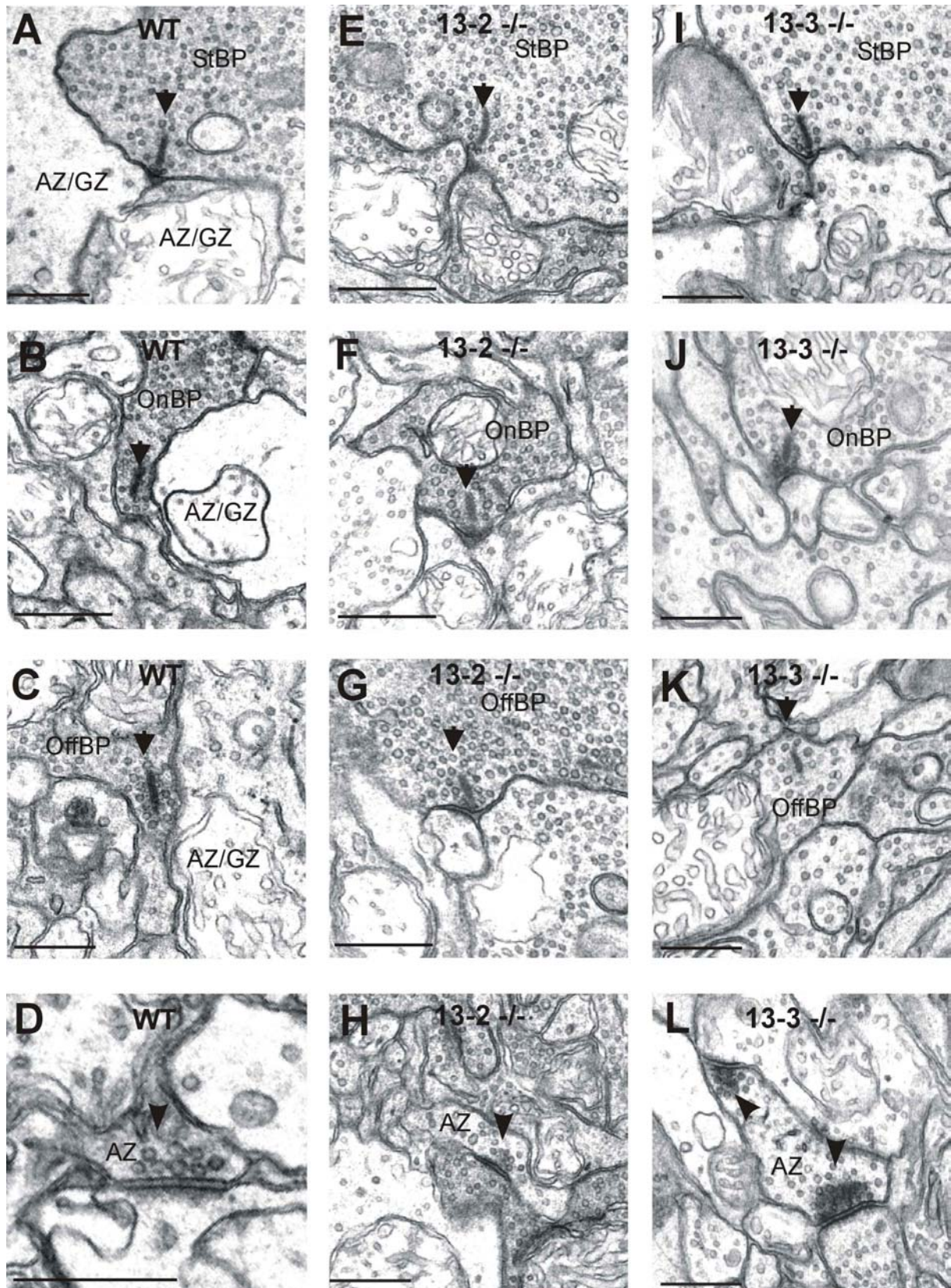


Abb. 29: Elektronenmikroskopische Aufnahme der IPL von wt-Retina (A-D), Munc13-2 (E-H) und Munc13-3-ko-Retina (I-L). Es ist jeweils ein Beispiel für die Synapsen der Stäbchen-Bipolarzelle, On-Bipolarzelle und der Off-Bipolarzelle sowie jeweils einer konventionellen Amakrinzellsynapse (D, H und L) gezeigt.

Die Ultrastrukturelle Analyse zeigt, daß kein Unterschied bei den verschiedenen Synapsen in der IPL zwischen WT und Munc13-2 bzw Munc13-3-KO vorliegt. StBP = Stäbchen-Bipolarzelle; OnBP = On-Bipolarzelle; OffBP= Off-Bipolarzelle, AZ= Amakrinzelle, GZ= Ganglienzelle; Maßstab:0,5µm

3.2.2 Elektretinogramm (ERG)

Die strukturelle Untersuchung der Munc13-2 und Munc13-3 ko-Retina hat zellulär und synaptisch keinen Phänotyp gezeigt. Da aus der Literatur bekannt ist, daß Synapsen, denen ein Protein „fehlt“, funktionell verändert, aber morphologisch normal sein können, wurde im nächsten Schritt mit Hilfe des ERG an Munc13-2 und Munc13-3-ko Mäusen die retinale Funktionserhaltung untersucht (Augustin *et al*, 1999 b; Brose *et al*, 2000).

Die ERG-Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Josef Ammermüller (Arbeitsgruppe Neurobiologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg). Ein ERG zeigt die Summe der Aktivität aller Zellen in der Retina. Die Retina wird mit kurzen Lichtreizen definierter Intensität stimuliert und die „Antwort“ (=Summenpotential) darauf gemessen. Der zeitliche Verlauf des ERG zeigt charakteristische Komponenten, die einzeln analysiert werden können.

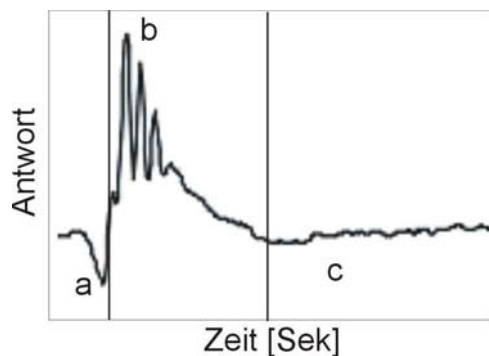


Abb. 30: Einteilung des ERG in die 3 Komponenten a-Welle, b-Welle und c-Welle. Die Oszillationen der b-Welle werden wahrscheinlich durch die Aktivität der Horizontal- oder Amakrinzellen verursacht.

Man teilt die ERG-Kurve in drei Komponenten a-Welle, b-Welle und c-Welle auf (Abb. 30, Dowling, 1987). Es ist bisher noch nicht vollständig geklärt, welcher Herkunft die verschiedenen Wellen sind, aber man geht davon aus, daß die a-Welle von den Photorezeptoren und die b-Welle von nachgeschalteten Neuronen erzeugt wird, während die c-Welle durch Aktivität nicht-neuronaler Zellen, z.B. Müllerzellen oder Pigmentepithel entsteht (Frishman und Steinberg, 1989).

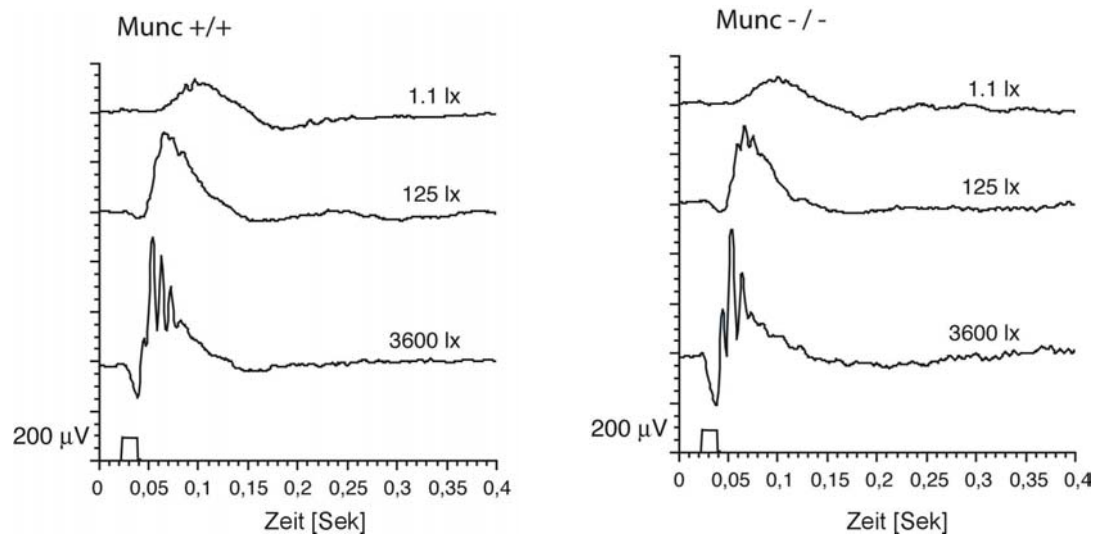


Abb. 31: Ableitbeispiele für skotopische ERG-Aufnahme von WT (Munc +/+), Munc13-2-KO und Munc13-3-KO (Munc -/-). Die Amplituden zeigen keinen Unterschied zwischen WT und KO-Retina. Zur Vereinfachung wurden die Ableitungen von Munc13-2 und Munc13-3 zusammengefasst. Die Dauer des Lichtreizes ist auf der Zeit-Achse markiert. Lx=Lux; µV=mikroVolt, Sek= Sekunden

In Abb.31 sind Aufnahmen von ERGs bei verschiedenen Lichtintensitäten für die WT und Munc13-2 und Munc13-3-KO Retina dargestellt. Bei hohen Lichtintensitäten erkennt man am Anfang des ERGs einen Ausschlag der Kurve nach unten. Es handelt sich hierbei um die a-Welle, die bei wt und Munc13-ko vergleichbar ist. Der darauf folgende Anstieg ist die b-Welle, die ebenfalls bei wt- und ko-Retina gleich ist. Oszillationen konnten sowohl bei wt als auch ko-Retina beobachtet werden. Die c-Welle, die auf der Aktivität von nicht-neuronalen Zellen beruht, wurde nicht näher untersucht. Die Analyse der a- und b-Welle ist in Abb. 32 dargestellt.

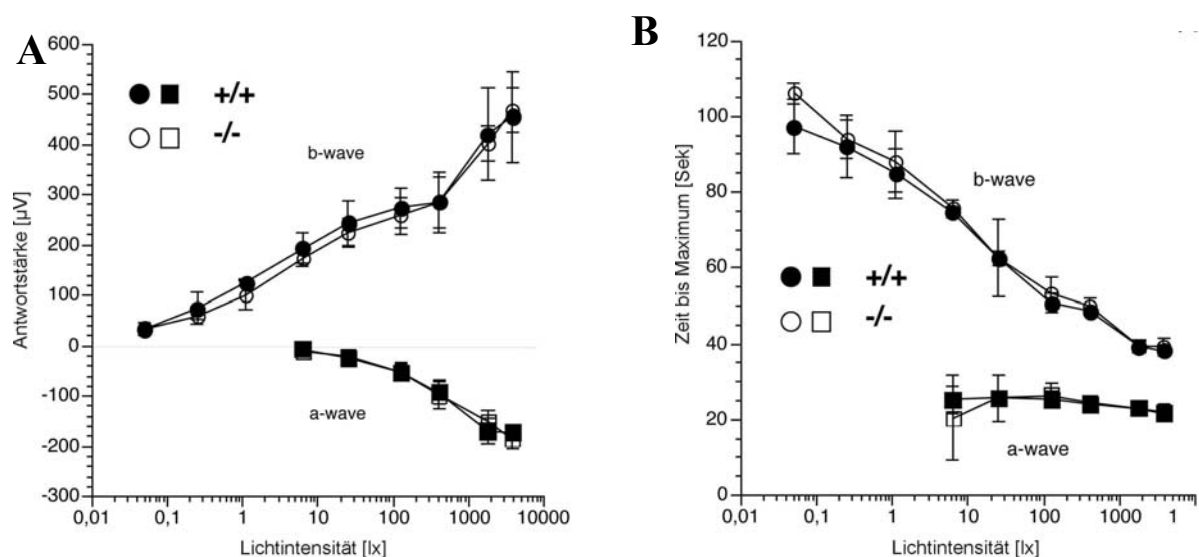


Abb.: 32 Auswertung der ERG Daten. A: Das Diagramm zeigt die ERG Antwort in Abhängigkeit von der Lichtintensität des Stimulus, B: Das Diagramm zeigt die Zeit bis zum Erreichen des Maximums in Abhängigkeit von der Lichtintensität. WT-Daten sind in schwarz, KO-Daten in weiss, die Quadrate stellen die a-Welle, Kreise die b-Welle dar. Es gibt keine Unterschiede in den ERGs von wt- und Munc13-2 bzw Munc13-3-ko-Retina.

Für die qualitative Auswertung wurden die maximalen Amplituden der a- und b-Wellen gegen die Reizintensität aufgetragen (Abb.32 A). Es konnten keine Unterschiede zwischen wt- und Munc13-ko festgestellt werden. Auch bei der Anstiegszeit (Zeit bis Maximum) als Funktion der Lichtintensität zeigen sich keine Unterschiede (Abb.32 B).

3.3 Untersuchungen einer organotypischen Retina-Kultur der Munc13-1-ko-Maus

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Munc13-2 und Munc13-3-ko-Retina lassen darauf schliessen, daß diese beiden Munc13-Proteine keine wesentlichen Funktionen an den Synapsen der Retina haben. Für eine unersetzbare Funktion kam daher das ubiquitär exprimierte Munc13-1 in Frage. Da Munc13-1-ko-Mäuse bei der Geburt sterben, wurden die immunzytochemischen Experimente an organotypischen Retina-Kulturen durchgeführt. Die organotypische Retina-Kultur eignet sich gut zur Untersuchung der Entwicklung von Neuronen und ihren Verschaltungen, sowie der Ausbildung von synaptischen Kontakten, da die Retina auch *in-vitro* ihre charakteristische nukleäre und synaptische Schichtung ausbildet. Im Folgenden werden die *in-vitro*-Retinae von wt-Mäusen mit denen von Munc13-1-Mäusen verglichen.

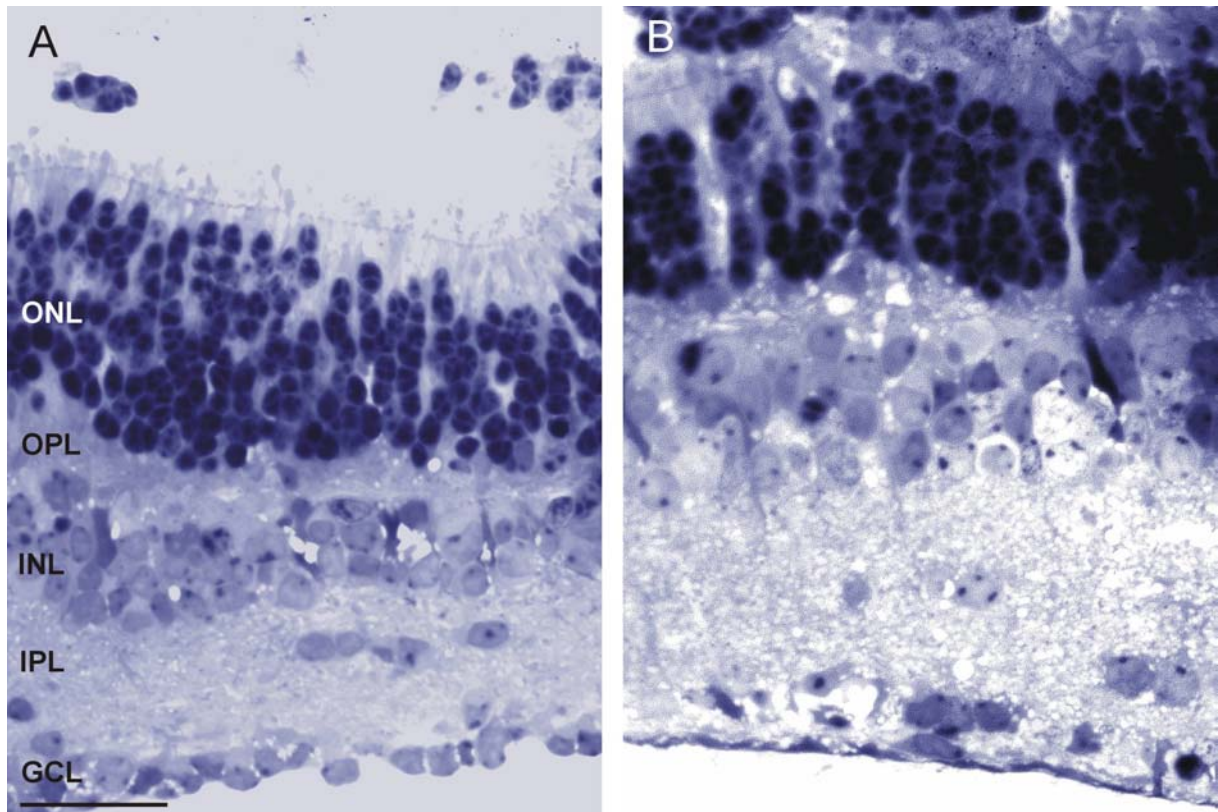


Abb.33: Toluidinblau-gefärbte Semidünnschnitte von organotypischen Retina-Kulturen A: wt-Retina, B: Munc13-1-ko –Retina. Man erkennt in der Anatomie keinen Unterschied zwischen wt und ko-Retina. ONL=äußere nukleäre Schicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, INL=innere nukleäre Schicht, IPL= innere plexiforme Schicht, GCL=Ganglienzellschicht, Maßstab: 25µm

Um die Anatomie der wt-Retina und der Munc13-1-ko-Retina zu vergleichen, wurden Semidünnschnitte mit Toluidinblau angefärbt. Die Retinae beider Genotypen zeigen die charakteristische Ausbildung mit den drei Zellkörperschichten und den zwei synaptischen Schichten. Man kann keinen Unterschied in der Anatomie feststellen (Abb.33).

3.3.1 Immunzytochemische Analyse der Munc13-1-KO organotypischen Retinakultur

Um die organotypischen Kulturen der Munc13-1-ko-Retina genauer zu untersuchen, wurden immunzytochemische Färbungen mit Antikörpern durchgeführt, die verschiedene Neuronenpopulationen und Synapsen markieren.

3.3.1.1 Horizontal-, Amakrin-, Bipolar-, Ganglien- und Gliazellen

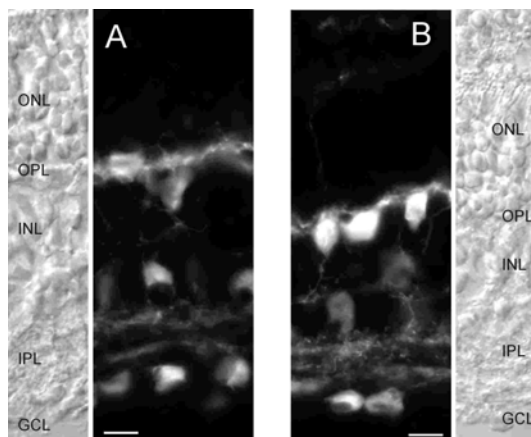


Abb. 34: Immunfluoreszenz-Färbungen der Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen mit einem Antikörper gegen Calbindin zeigen keinen Unterschied zwischen WT-Kultur (A) und Munc13-1KO-Kultur (B). Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10 μ m

Abbildung 34 zeigt die Färbung von Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen in den Kulturen von wt-Retina und Munc-13-1-ko-Retina mit einem Antikörper gegen Calbindin (s.3.1.3.2.). Es ist kein Unterschied in der Ausbildung der verschiedenen Zelltypen zu sehen. Die unterschiedliche Dicke der Retina kommt nicht durch den unterschiedlichen Genotyp zustande, sondern liegt an der Region aus der die Aufnahmen stammen: In der Kultur ist die Retina nach außen hin dünner.

Auch für alle anderen untersuchten Zelltypen konnte kein Unterschied zwischen wt- und Munc13-1-ko-Retina-Kultur festgestellt werden: Glyzinerge Amakrinzellen und On-Bipolarzellen wurden mit einem Antikörper gegen Glyzin (Pow *et al*, 1995) markiert, cholinerge Amakrinzellen mit einem Antikörper gegen Caldendrin (Seidenbecher *et al*, 1998) und alle On-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen G0 α (Vardi *et al*, 1993; Vardi, 1998). Müller-Gliazellen wurden mit einem Antikörper gegen Glutaminsynthetase selektiv markiert (Haverkamp und Wässle, 2000).

3.3.1.2 Stäbchen-Bipolarzellen

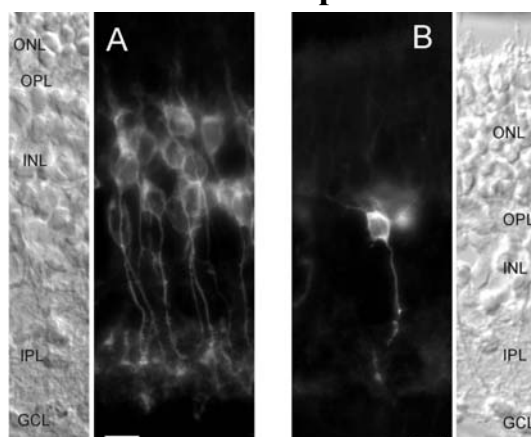


Abb. 35: Immunfluoreszenz-Färbung der Stäbchen-Bipolarzellen mit einem Antikörper gegen PKC α . Die Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen scheint in der Munc13-1-ko-Kultur (B) im Vergleich zur wt-Kultur (A) dramatisch verringert.

Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10 μ m

Abbildung 35 zeigt einen Vergleich PKC α -gefärbter wt- und Munc13-1-ko-Retinae. Die Zahl der PKC α -positiven Stäbchen-Bipolarzellen scheint bei der Munc13-1-ko-Retina dramatisch reduziert zu sein. Um diesen Befund quantitativ zu überprüfen, wurden von den mit PKC α -gefärbten Retina-Schnitten lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, die in der Montage die gesamte Retina von inferior nach superior zeigen (Abb. 36).

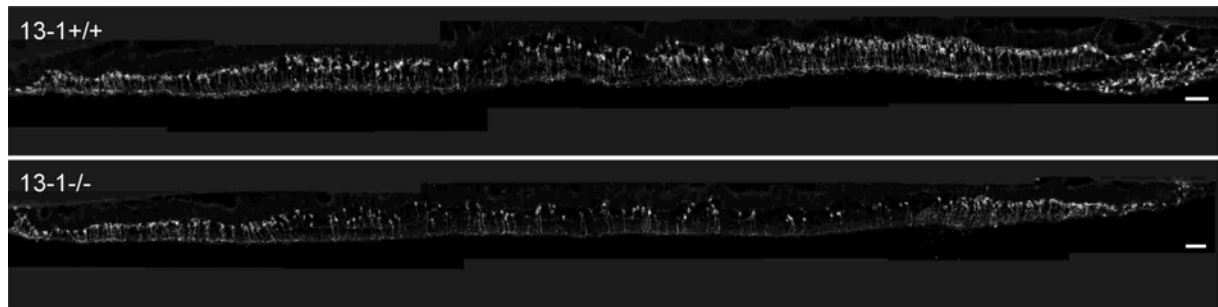


Abb. 36: PKC α -Färbung am Vertikalschnitt der wt- (13-1+/+) und Munc13-1-ko-Kultur (13-1 -/-). Die Rekonstruktion zeigt die ganze Retina von inferior nach superior. Die Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen ist in der Munc13-1-ko-Retina-Kultur geringer als in der wt-Kultur. Maßstab: 50 μ m (Abbildung vergrößert in Anhang 1)

Wie am Beispiel in Abbildung 36 gezeigt ist, scheint die Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen in der Munc13-1-ko-Retina auch über größere Bereiche reduziert. Die Quantifizierung in verschiedenen wt und Munc13-1-ko-Kulturen ergibt jedoch ein anderes Bild.

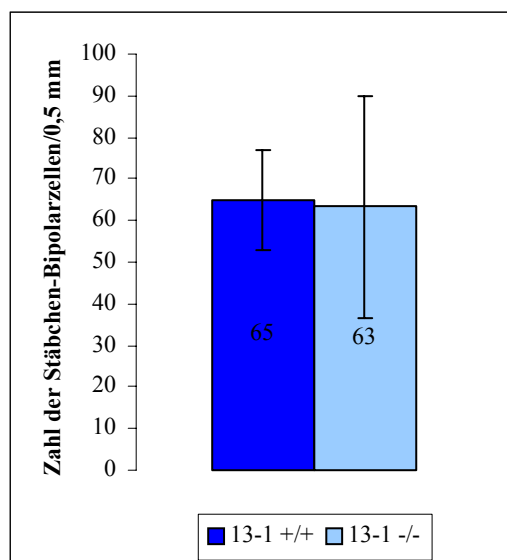


Abb. 37: Auszählung der PKC gefärbten Stäbchen-Bipolarzellen am Vertikalschnitt in definierten Abschnitten der Retina. Die Angaben sind die Mittelwerte der gezählten Zellen pro 0,5mm mit Standardabweichung; N(WT)=8, N(KO)=10 Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen WT und Munc13-1-KO.

Es wurden die Stäbchen-Bipolarzellen bei jeweils einem Schnitt von insgesamt 8 wt-Kulturen und 10 Munc13-1-ko-Kulturen ausgezählt. Die Anzahl bezieht sich jeweils auf einen Abschnitt von 0,5 mm. Die statistische Auswertung (SIGMA Stat) ergab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen.

3.3.1.3 Lichtmikroskopische Analyse der Synapsen in der Munc13-1-ko-Kultur

In Immunfärbungen mit Antikörpern, die verschiedene prä- und postsynaptische Proteine markieren, wurde untersucht, ob sich das Fehlen von Munc13-1 auf die synaptische Ebene auswirkt.

3.3.1.3.1 Die Präsynapse

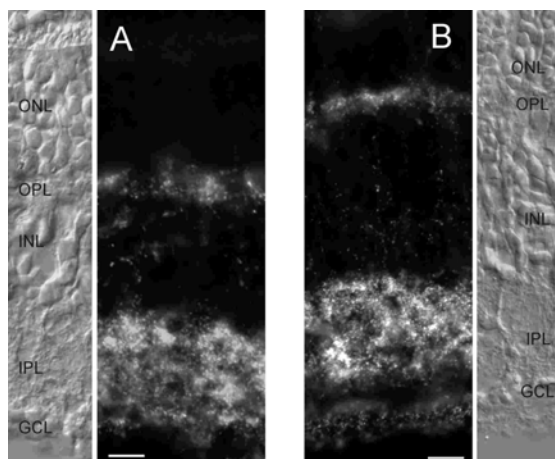


Abb.38: Die immunzytochemische Lokalisierung von Bassoon zeigt keinen Unterschied zwischen der Kultur von wt-Retina (A) und Munc13-1-ko-Retina (B). Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10µm

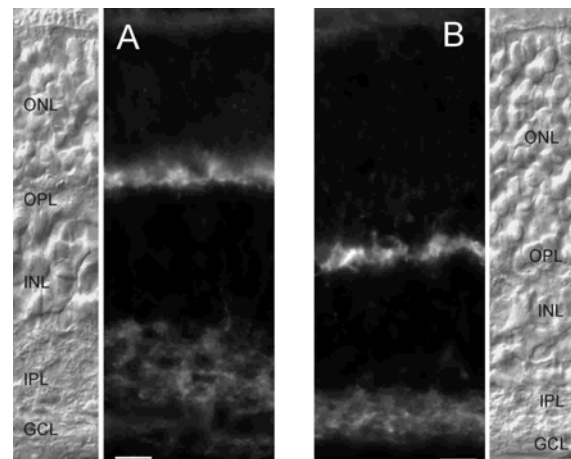


Abb.39: Die immunzytochemische Lokalisierung von Synaptophysin zeigt keinen Unterschied zwischen der Kultur von wt-Retina (A) und Munc13-1-ko-Retina (B). Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10µm

Um die präsynaptische Seite der verschiedenen Synapsentypen der Retina – Bandsynapsen und konventioneller Synapsen - zu markieren, wurden Antikörper gegen das Zytomatrixprotein Bassoon und gegen das synaptische Vesikelprotein Synaptophysin eingesetzt (Dick *et al*, 2001, Brandstätter *et al*, 1999, Richter *et al*, 1999). Zusätzlich wurde mit einem Antikörper gegen den vesikulären Glutamat-Transporter I (Vglut1; Takamori *et al*, 2000) gefärbt, der alle glutamatergen Synapsen der Retina markiert (Haverkamp und Wässle,

2000 (nicht gezeigt)). Der Vergleich der Färbungen zwischen wt-Retina und Munc13-1-ko-Retina zeigt keine Unterschiede in der Stärke der Expression und der Verteilung der Proteine (Abb. 38 und 39).

3.3.1.3.2 Die Postsynapse

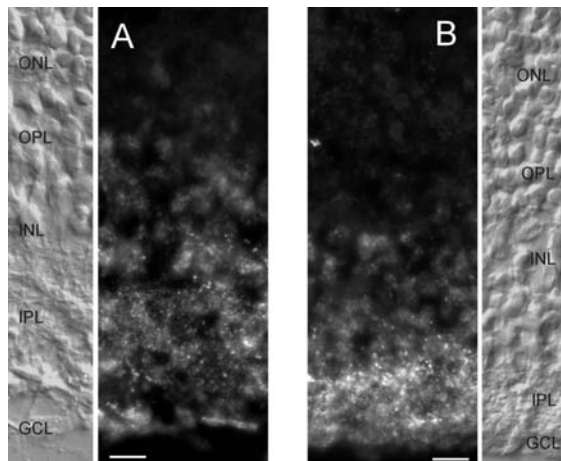


Abb. 40: Die immunzytochemische Lokalisierung von Gephyrin zeigt keinen Unterschied zwischen der Kultur von wt-Retina (A) und Munc13-1-ko-Retina (B). Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10µm

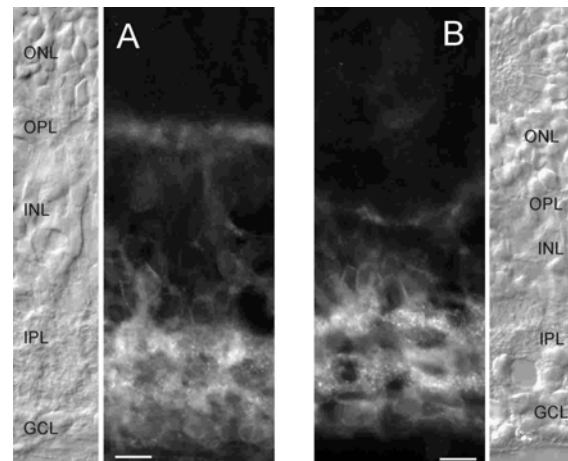


Abb. 41: Die immunzytochemische Lokalisierung von GluR2/3 zeigt keinen Unterschied zwischen der Kultur von wt-Retina (A) und Munc13-1-ko-Retina (B). Die Nomarski Aufnahmen zeigen die Schichten der Retina; Maßstab: 10µm

Um beispielhaft die postsynaptische Seite von glyzinerger, GABAergen und glutamaterger Synapsen in der Retina zu markieren, wurden Antikörper gegen das Aggregationsprotein Gephyrin und die Untereinheiten GluR2 und GluR3 des AMPA Glutamatrezeptors (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure) eingesetzt (Hack *et al*, 2001, Hollmann und Heinemann, 1994). Gephyrin ist ein postsynaptisches Protein, das bei der Aggregation von Glyzin- und GABA-Rezeptoren eine Rolle spielt (Kirsch *et al*, 1993, Kneussel *et al*, 2000 und 2001).

Auch für diese postsynaptischen Proteine wurde kein Unterschied in der Stärke der Expression und in der Verteilung zwischen wt- und Munc13-1-ko-Retina-Kulturen gefunden (Abb. 40 und 41). Die Unterschiede in der Dicke der Retina liegen an der Auswahl der Regionen und nicht am Genotyp.

3.3.2 Ultrastrukturelle Untersuchung der Synapsen in der organotypischen Kultur der Munc13-1-knock-out-Retina

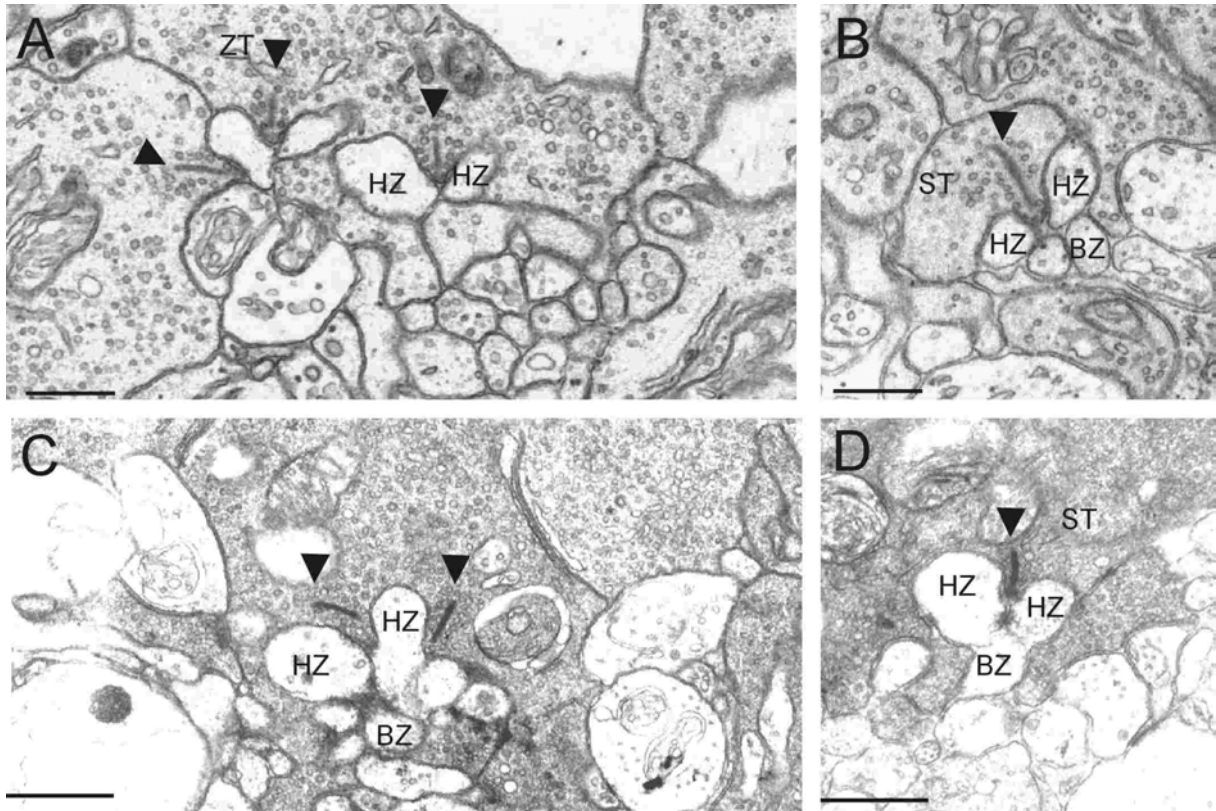


Abb. 42: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bandsynapsen in Zapfen-Terminalien (ZT) und Stäbchen-Terminalien (ST) in WT-Kultur und Munc13-1-KO-Kultur. Es gibt keinen Unterschied in der Ausbildung der Synapsen zwischen WT (A und B) und Munc13-1-KO (C und D). Die postsynaptischen Elemente der Horizontal- und Stäbchenbipolarzellen invaginieren in das synaptische Terminal und das präsynaptische Band ist an der aktiven Zone verankert (Pfeil). BZ=Bipolarzelle, HZ=Horizontalzelle Maßstab:0,5µm

Der ultrastrukturelle Vergleich der Photorezeptor-Terminalien mit ihren Bandsynapsen zeigt keinen Unterschied zwischen wt-Retina- und Munc13-1-ko-Retina-Kulturen. Auch in der Munc13-1-defizienten Retina sind die synaptischen Bänder an der präsynaptischen Membran verankert und ihnen gegenüber liegen die postsynaptischen Fortsätze der Horizontal- und Bipolarzellen (Abb. 42).

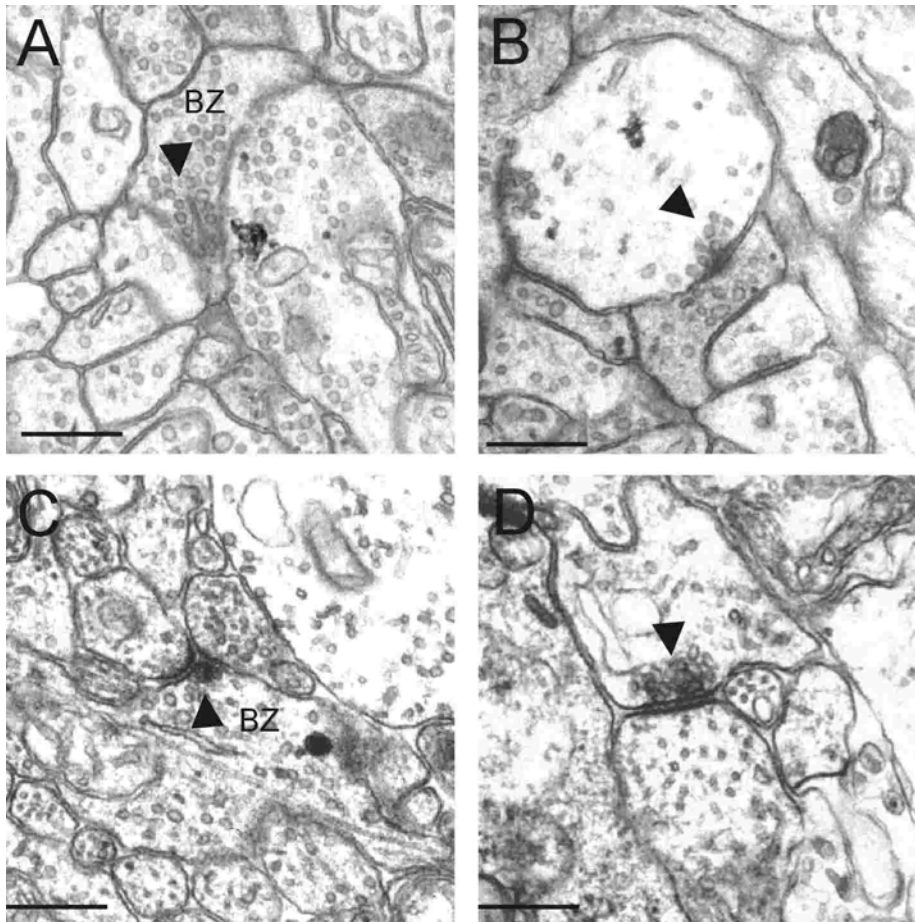


Abb. 43: Elektronenmikroskopische Aufnahme von den Synapsen der IPL. Es gibt keinen Unterschied in der Ausbildung von Bipolarzell-Band-Synapsen (A und C) und konventionellen Synapsen (B und D) zwischen WT (A und B) und Munc13-1-KO (C und D) BZ=Bipolarzelle, die Pfeile markieren das synaptische Band (A, C) bzw die aktive Zone der konventionellen Synapse (B,D). Maßstab:0,5µm

In Abbildung 43 sind Beispiele von verschiedenen Synapsentypen in der IPL von wt- und Munc13-1-ko-Retina gezeigt. Der ultrastrukturelle Vergleich der Bandsynapsen der Bipolarzellen, sowie der konventionellen Synapsen der Amakrinzellen zwischen WT und KO zeigt keinen Unterschied.

Zusammen ergaben die Untersuchungen an den organotypischen Kulturen keinen qualitativen Phänotyp an den Synapsen. Auf zellulärer Ebene konnte ein Phänotyp in der Ausbildung der Stäbchen-Bipolarzellen statistisch nicht bestätigt werden, so daß hier nicht entschieden werden kann, ob der subjektive Eindruck täuscht. Diese erstaunlichen Ergebnisse bedürfen einer kritischen Diskussion.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, mit molekularen, neuroanatomischen und physiologischen Methoden (I) die Verteilung und (II) die Bedeutung der gehirnspezifischen Munc13-Proteine für die Entwicklung der Retina, sowie ihre Funktion an den verschiedenen Synapsen herauszufinden.

4.1 Verteilung und Funktion von *Munc13* an den Synapsen des Gehirns

Die hirsnspezifischen Munc13-Proteine, Munc13-1, Munc13-2 und Munc13-3, wurden 1995 erstmals in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T.C. Südhof (Department of Molecular Genetics, Universität Texas, USA) beschrieben (Brose *et al*, 1995). *In-Situ*-Hybridisierungs-Experimente zur Verteilung der Munc13-Transkripte im Gehirn zeigten eine ubiquitäre Expression von Munc13-1, sowie ein Regionen spezifisches, nicht überlappendes Expressionsmuster von Munc13-2 und Munc13-3 (Augustin *et al*, 1999 a). Munc13-Proteine spielen als Priming-Faktoren eine wichtige Rolle bei der vesikulären Freisetzung von Neurotransmittern an den Synapsen des Gehirns. So bewirkt das Fehlen von Munc13-1 in Hippocampuskulturen, daß 90% der glutamatergen Synapsen keinen Neurotransmitter mehr freisetzen können (Augustin *et al*, 1999 b). Munc13-2 übt seine Funktion als Priming-Faktor an den restlichen 10% der glutamatergen und an allen GABAergen Synapsen aus die Munc13-1-unabhängig sind. Elektrophysiologische Studien an Hippocampuskulturen einer Munc13-1-Munc13-2 „doppel“-knock-out-Maus zeigten, daß keine synaptische Aktivität an glutamatergen und GABAergen Synapsen mehr stattfindet (Varoqueaux *et al*, 2002).

Die Munc13-2 „einfach“-knock-out-Maus zeigt dagegen keine Veränderung der synaptischen Transmission (Augustin *et al*, 1999 b). Dies bedeutet, daß es verschiedene Formen von Synapsen gibt: GABAerge Synapsen, in denen Munc13-1 und Munc13-2 redundant sind, und zwei Formen glutamaterger Synapsen. Davon setzt eine ausschliesslich Munc13-1 als Priming Faktor ein und die andere Munc13-2. Für Munc13-3 gibt es, ausser in der vorliegenden Arbeit, bisher keine Daten zur Expression und Funktion an den Synapsen des Gehirns. Trotz des deutlichen funktionellen Phänotyps des Munc13-1-„einfach“-knock-out und des Munc13-1-13-2-doppel-knockout - *Synapsen setzen keinen Transmitter mehr frei-*, konnte an den Synapsen des Gehirns kein struktureller Phänotyp festgestellt werden. Die Verteilung der Munc13-mRNAs im Gehirn - (I) Munc13-1 in allen Gehirnregionen und (II) Munc13-2 und Munc13-3 in unterschiedlichen, sich nicht überlappenden Gehirnregionen- sowie die

funktionelle Analyse der Munc13-1-, Munc13-2-„einfach-knock-out“ und Munc13-1-13-2-„doppel-knock-out“-Maus lassen die Schlussfolgerung zu, daß Munc13-1 das *funktionell wichtigste* der Munc13-Proteine ist.

4.2 Munc13 in der Retina

Für die Studien an der Retina wurde zuerst die Verteilung der Munc13-mRNAs mit *In-Situ*-Hybridisierung untersucht. Die Retina eignet sich besonders gut als Untersuchungssystem, weil sie gut erforscht ist, weil die Experimente am vollständigen Gewebeverband durchgeführt werden und man nicht isolierte Regionen oder Zellen getrennt vom „Organ“ untersucht und schliesslich, weil in der Retina verschiedene Arten von Zellen, Neurotransmittern und Synapsen vorkommen.

Es zeigte sich, daß Munc13-1mRNA in der Retina ubiquitär von allen Neuronentypen exprimiert wird. Die mRNAs von Munc13-2 und Munc13-3 findet man in nicht überlappenden Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellpopulationen. Damit sind die Photorezeptoren der Retina eine Neuronenpopulation, die ausschließlich Munc13-1 exprimiert. Alle anderen Neurone der Retina exprimieren Kombinationen von Munc13-1 mit entweder Munc13-2 oder Munc13-3.

Mit der *In-situ*-Hybridisierung kann man prinzipiell zeigen, in welchen Zellpopulationen die Proteine potentiell exprimiert werden, aber es ist nicht möglich zu sagen, wo in der Zelle das Protein exprimiert wird. Die zelluläre Lokalisation und die Ausstattung der einzelnen Synapsen mit Munc13-Proteinen wurde deshalb mit immunzytochemischen Methoden untersucht.

4.2.1 Munc13-1 ist ein präsynaptisches Protein an der Photorezeptor-Bandsynapse

Die licht- und elektronenmikroskopische Auswertung der Experimente zur Lokalisation von Munc13-1 in den Photorezeptoren zeigte, daß Munc13-1 präsynaptisch an der Basis des synaptischen Bandes der Photorezeptor-Synapse exprimiert wird. An der Basis des synaptischen Bandes liegt die aktive Zone der Synapse, an der kontinuierlich die vesikuläre Freisetzung von Glutamat auf die postsynaptischen Zellen – Horizontal- und Bipolarzellen - stattfindet (Copenhagen und Jahr, 1989; Massey, 1990; Brandstätter und Hack, 2001). Die Freisetzung von Glutamat an der Photorezeptorsynapse ist rein tonisch (DeVries und Baylor, 1993; Rieke und Schwartz, 1996). Da Munc13-1 als einziges der drei Munc13-Proteine an der Photorezeptorsynapse vorliegt, muss es hier eine essentielle Funktion bei der Freisetzung von Glutamat ausüben.

Aus der Literatur ist bekannt, daß an der Photorezeptorsynapse Formen synaptischer Proteine vorliegen, die man an anderen Synapsen nicht findet. Beispielsweise wird an der Photorezeptorsynapse Syntaxin3 anstelle von Syntaxin1 exprimiert. Syntaxin1 ist Bestandteil des SNARE-Komplexes und wichtig für die Freisetzung von Neurotransmitter. Dies bedeutet, daß der SNARE-Komplex der Photorezeptorsynapse ein spezielles Syntaxin, nämlich Syntaxin3 einsetzt (Brandstätter *et al*, 1996 a; Morgans *et al*, 1996). Die Freisetzung von Neurotransmitter kann nur nach einem Einstrom von Kalzium in das präsynaptische Terminal stattfinden. Für diesen Einstrom sind spezielle Kalzium-Kanäle zuständig: an konventionellen Synapsen sind dies die schnell inaktivierenden P-,Q- und N-Typ Kalziumkanäle (Takahashi und Momiyama, 1993, Wheeler *et al*, 1994, Dunlap *et al*, 1995) während man in Photorezeptor-Bandsynapsen die langsam inaktivierenden L-Typ-Kalzium-Kanäle findet (Heidelberger und Matthews, 1992; Rieke und Schwartz, 1994; Satoh *et al*, 1998; Taylor und Morgans, 1998). Die unterschiedliche Kinetik in der Art der Transmitterfreisetzung zwischen Bandsynapsen und konventionellen Synapsen spiegelt sich in einer unterschiedlichen Proteinausstattung der Präsynapse wieder: Munc13-1 wird zusammen mit Syntaxin 3 an Photorezeptor-Bandsynapsen exprimiert, während an Amakrinzell-Synapsen Munc13-1 zusammen mit Syntaxin 1 vorliegt. Die L-Typ-Kalziumkanäle sind ausserdem medizinisch von Bedeutung, weil Veränderungen an Ihnen Ursache für kongenitale Nachtblindheit sind (Strom *et al*, 1998).

Der Befund, daß Munc13-1 präsynaptisch an den Photorezeptor-Bandsynapsen exprimiert wird, überrascht dennoch, weil in einer früheren Publikation beschrieben wurde, daß Munc13-1 *nicht* an den Photorezeptor-Synapsen vorkommt (Schmitz *et al*, 2001). In dieser Publikation verglichen die Autoren die Immunfärbung eines Antikörpers, der spezifisch die synaptischen Bänder in den Bandsynapsen markiert, mit der Immunfärbung von Munc13-1. Die Färbung der synaptischen Bänder zeigte sich in der OPL sehr intensiv und in der IPL wesentlich schwächer. Die Färbungs-Intensität von Munc13-1 zeigte ein dazu komplementäres Muster: schwach in der OPL und sehr stark in der IPL (Schmitz *et al*, 2001). Der überwiegende Anteil der Synapsen in der OPL sind die Bandsynapsen (Copenhagen und Jahr, 1989; Missotten, 1965; Dowling und Boycott, 1966). Die nicht vorhandene Färbung für Munc13-1 in der OPL, sowie die nicht vorhandene Kollokalisierung von Munc13-1 und dem Bandsynapsen-Marker in der IPL, ließ Schmitz *et al* darauf schließen, daß (I) Munc13-1 gar nicht an Bandsynapsen exprimiert wird und daß (II) alle tonisch freisetzenden Synapsen der Retina, wie die Bandsynapsen, einen Munc13-1-unabhängigen Freisetzungmechanismus haben, alle

phasischen Synapsen hingegen, wie die konventionellen Synapsen in der IPL, Munc13-1 benötigen.

Eine Ursache für die Diskrepanz zwischen den hier vorgelegten Daten und denen von Schmitz *et al* könnte in einer unterschiedlichen Behandlung des Gewebes liegen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind viele Antikörper fixierempfindlich, so daß der richtige Kompromiss zwischen Gewebeerhalt und Antikörper-Antigen-Bindung herausgefunden werden muss. Bei stark fixiertem Gewebe kommt es schnell zu einer schlechten Bindung des Antikörpers an sein Antigen, das gilt v.a. auch für den Antikörper gegen Munc13-1. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, daß in den Untersuchungen von Schmitz *et al* die Retina zu lange fixiert wurde.

In der OPL findet man an den Terminalien der Zapfen neben der Bandsynapse einen weiteren Synapsentyp, die „Basal-Synapsen“. Sie unterscheiden sich von den Bandsynapsen dadurch, daß hier die Dendriten von Off-Bipolarzellen flache, nicht-invaginierende synaptische Kontakte mit dem Photorezeptor bilden. Diese Basal-Synapsen besitzen weder ein synaptisches Band, noch zeigen sie eine Akkumulation von Vesikeln an der präsynaptischen Seite (Raviola und Gilula, 1975; Brandstätter und Hack, 2001). An dieser Synapse werden die „Aktive-Zonen-Proteine“ Bassoon und Piccolo nicht exprimiert, so daß hier ein alternativer Transmitter-Freisetzungsmechanismus angenommen wird, der sich grundlegend von den bekannten Mechanismen in der Retina unterscheidet (Brandstätter *et al*, 1999; Dick *et al*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch Munc13-1 nicht an den Basal-Synapsen der Zapfen-Photorezeptoren exprimiert wird. Dieser Befund unterstützt damit ebenfalls die Hypothese eines andersartigen Freisetzungsmechanismus an dieser Synapse.

4.2.2 Munc13-1 und Munc13-3 sind postsynaptische Proteine

Die Untersuchungen zur Verteilung von Munc13-Proteinen in der Retina führten zu einem weiteren interessanten Ergebnis: Munc13-1 wird nicht nur an der präsynaptischen Seite der Photorezeptor-Bandsynapse exprimiert, sondern auch an der postsynaptischen Seite. Außerdem zeigte sich, daß Munc13-1 und Munc13-3 postsynaptisch zur Photorezeptor-Bandsynapse exprimiert werden. Man findet beide Proteine in den Fortsätzen von Bipolar- und Horizontalzellen. Munc13-3 wurde aber, im Gegensatz zu Munc13-1, *nicht* präsynaptisch gefunden.

Eine Reihe neuerer Untersuchungen zeigen, daß an den Synapsen des Gehirns verschiedene Proteine gleichermaßen an der Prä- und an der Postsynapse exprimiert werden, aber an den

beiden Seiten unterschiedliche Funktionen ausüben. NSF, ein gut charakterisiertes Protein, das essentiell für die Vesikelfusion und Transmitterfreisetzung an der Präsynapse ist (Rothman, 1994; Söllner und Rothmann, 1994). An der Postsynapse scheint NSF durch direkte Bindung an die GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors beim Transport und der Positionierung dieser Rezeptoren in der Membran wichtig zu sein (Noel *et al*, 1999; Sheng und Kim, 2002; Scannevin und Haganir, 2000; Osten *et al*, 1998; Nishimune *et al*, 1998, Song *et al*, 1998). Man weiß, daß die Anzahl der AMPA-Rezeptoren an der Synapse abhängig von der synaptischen Aktivität ist. Man nimmt an, daß der Mechanismus des Ein- und Ausbaus der Rezeptoren in die Membran der Endo- und Exocytose ähnlich ist und über SNARE-Proteine abläuft (Lu *et al*, 2001). Rezeptoren werden entweder indirekt über Vesikel oder direkt an die postsynaptische Membran gebracht, und hier könnten Munc13-1 bzw. Munc13-3 eine potentielle Funktion ausüben.

Die Expression von Munc13-1 und Munc13-3 in den Dendriten der Horizontalzellen lässt weitergehende Überlegungen zu. Die Horizontalzellen sind in der Retina nachgeschaltete Neuronen der Photorezeptoren. In das Photorezeptor-Terminal invaginieren, neben den Fortsätzen der Bipolarzellen, zwei Fortsätze von Horizontalzellen. Die Horizontalzellen stellen in der OPL die laterale Verschaltung zwischen den Photorezeptoren und den Bipolarzellen dar. Man nimmt an, daß sie dort durch die Freisetzung von GABA das Signal der Photorezeptoren modulieren. Die Horizontalzelle muss also „präsynaptische“ Eigenschaften besitzen. Der Mechanismus, vesikulär oder nicht-vesikulär, mit dem die Horizontalzellen GABA freisetzen, wird intensiv und kontrovers diskutiert (Baylor *et al*, 1971 a und b; Kamermans und Spekreijse, 1999; Pattnaik *et al*, 2000). Die Expression von Munc13-1 in den Fortsätzen von Horizontalzellen könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Freisetzung von GABA über Vesikel stattfindet. Dies würde bedeuten, daß Munc13-1 seine Funktion als Priming-Faktor bei der Exozytose von GABA in den Fortsätzen der Horizontalzellen ausübt.

4.2.3 Munc13 Expression an den verschiedenen Synapsen der IPL

Während in der OPL die Mehrzahl der Synapsen die glutamatergen Band-Synapsen der Photorezeptoren sind, findet man in der IPL eine Mischung aus den glutamatergen Bandsynapsen der Bipolarzellen und den vorwiegend GABAergen und glyzineren konventionellen Amakrinzell-Synapsen (Wässle und Boycott, 1991).

4.2.3.1 An den Band-Synapsen der Bipolarzellen wird kein Munc13 exprimiert

Die Bandsynapsen der Bipolarzellen in der IPL sind, trotz morphologischer Ähnlichkeit mit den Bandsynapsen der Photorezeptoren, funktionell unterschiedlich, was sich in einer zum Teil unterschiedlichen Protein-Ausstattung zeigt. Ein aktuelles Beispiel dafür ist das Zytomatrixprotein Bassoon, das an den Bandsynapsen der Photorezeptoren, aber nicht an denen der Bipolarzellen vorkommt (Brandstätter *et al*, 1999).

An den Bandsynapsen der Bipolarzellen wurde *keines* der Munc13-Proteine gefunden. Das war besonders überraschend, weil sowohl Munc13-1 als auch Munc13-3 mRNA in Bipolarzellen nachgewiesen wurde. Die Erklärung dafür ist, daß Munc13-1 und Munc13-3 Proteine in den Bipolarzellen nicht präsynaptisch in ihren Axonen lokalisiert ist, sondern in ihren Dendriten in der OPL (siehe oben). Für Munc13-2 konnten keine immunzytochemischen Experimente durchgeführt werden, weil kein Antikörper zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der *In-Situ*-Hybridisierungen schließen jedoch die Expression von Munc13-2 an Bipolarzellen aus. Das bedeutet, daß es mit der Band-Synapse der Bipolarzellen einen Synapsentyp in der Retina gibt, der keines der bekannten Munc13-Proteine besitzt. Hier stellt sich nun die Frage, wie diese Synapsen den Neurotransmitter freisetzen. Es gibt zwei Möglichkeiten: (I) ein Munc13-unabhängiger Mechanismus ist für die Freisetzung verantwortlich, oder (II) es gibt ein bislang unbekanntes Munc13-Protein, das spezifisch an den Bipolarzell-Bandsynapsen vorkommt.

4.2.3.2 Munc13 Proteine werden an konventionellen Amakrinzell-Synapsen exprimiert

Die starke, punktierte Färbung für Munc13-1 und Munc13-3 in der IPL ist also nicht auf eine Expression der beiden Proteine an den Bandsynapsen der Bipolarzellen zurückzuführen, sondern auf eine Expression an den konventionellen Amakrinzellsynapsen, was sich in den immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigte. Munc13-1 und Munc13-3 wurden sowohl präsynaptisch an den konventionellen Amakrinzellsynapsen gefunden, als auch in den Fortsätzen von Amakrinzellen, die postsynaptisch zu den Terminalien der Bipolarzellen sind. Hier kann allerdings nicht eindeutig von einer postsynaptischen Lokalisation gesprochen werden, weil bekannt ist, daß Amakrinzellen reziproke Synapsen auf Bipolarzellen ausbilden (Dowling und Boycott, 1966; Sandell und Masland, 1986; Vaney, 1986; Strettoi *et al*, 1990; Zhang *et al*, 2002).

Da die *In-Situ*-Hybridisierung die Expression von Munc13-2 mRNA in einer Subpopulation von Amakrinzellen zeigt, kann man davon ausgehen, daß alle drei Munc13-Proteine an den Synapsen der Amakrinzellen exprimiert werden - aber nicht gleichzeitig von derselben Zelle. So zeigte die Doppelfärbung von Munc13-1 und Munc13-3, daß diese beiden Proteine in der IPL nur teilweise kolokalisiert vorkommen, so daß man annehmen kann, daß an den konventionellen Synapsen der Amakrinzellen Kombinationen von Munc13-1 mit Munc13-2 oder Munc13-3 exprimiert werden. Die Amakrinzell-Synapsen sind morphologisch und funktionell von den Bandsynapsen verschieden. In mehreren Studien der letzten Jahre wurden diese Unterschiede deutlich: Die unterschiedlichen Freisetzungsmodalitäten der Neurotransmitter zwischen Bandsynapsen und konventionelle Synapsen spiegeln sich in der unterschiedlichen Ausstattung mit synaptischen Proteinen wieder: Wie zuvor erwähnt, exprimieren die konventionellen Synapsen P-, Q- und N-Typ-Kalzium-Kanäle, während die Bandsynapsen L-Typ-Kalziumkanäle exprimieren. Des Weiteren werden Synapsin I und II nur von konventionellen Synapsen der IPL exprimiert und kommen an den Bandsynapsen gar nicht vor (Mandell, 1990). Die Ausstattung der konventionellen Amakrinzellen mit Munc13-Proteinen ist ebenfalls grundlegend anders als die der Bandsynapsen: Die konventionellen Synapsen der Retina exprimieren Kombinationen von Munc13-1 mit Munc13-2 oder Munc13-3, so daß hier nicht nur eine einzige Form von Munc13 die Funktion ausübt, wie das an den Photorezeptor-Bandsynapsen der Fall ist. Dieses Ergebnis wird durch die Tatsache unterstützt, daß erst der Doppel-Knockout von Munc13-1 und Munc13-3 dazu führt, daß an GABAergen Synapsen kein Transmitter mehr freigesetzt wird (Varoqueaux *et al*, 2002).

4.3 Die Bedeutung von Munc13-2 und Munc13-3 für die Retina

Die Lokalisierungsstudien von Munc13-2 und Munc13-3 in der Retina zeigten, daß die Proteine in Bipolarzellen und Amakrinzellen exprimiert werden. Um Aufschluss über die mögliche Bedeutung dieser beiden Proteine für die Entwicklung und Funktion der Retina zu erhalten, wurden die Retinae von Munc13-2 und Munc13-3-ko-Mäusen untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, daß sich die Retinae vollkommen normal ausbilden – von der Ausbildung der einzelnen Körnerschichten und synaptischen Schichten, über die Ausbildung der verschiedenen Neuronentypen und ihrer Verschaltungen, bis hin zur synaptischen Ultrastruktur. Die ERGs der Retinae von Munc13-2 und Munc13-3-ko zeigten ebenfalls keinerlei Unterschiede zu den ERGs wildtypischer Mäuse. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen aus den morphologischen und funktionellen Untersuchungen am Gehirn von

Munc13-2-ko-Mäusen überein, wo sich ebenfalls kein Phänotyp zeigte (Augustin *et al*, 1999 b, Varoqueaux *et al*, 2002).

Zur Funktion oder Lokalisation von Munc13-3 an den Synapsen des Gehirns gab es bisher keine Untersuchungen. In dieser Arbeit wurde erstmals die Verteilung und Expression von Munc13-3 an den Synapsen untersucht. Die Lokalisation von Munc13-3 an den Synapsen der Amakrinzellen deutet auf eine synaptische Funktion hin. Das Fehlen eines Phänotyps in der Munc13-2- und Munc13-3-ko Maus zeigt, daß Munc13-1 an diesen Synapsen eine Hauptfunktion hat und im knock-out den Ausfall von Munc13-2 und Munc13-3 kompensieren kann.

4.4 Die Bedeutung von Munc13-1 für die Retina

Munc13-1 ist in der Retina und im Gehirn ubiquitär exprimiert (Augustin *et al*, 1999 a; vorliegende Arbeit). Da das genetische „Ausschalten“ von Munc13-1 dazu führt, daß die Mäuse direkt nach der Geburt sterben, wurden die Untersuchungen zur Funktion von Munc13-1 an einem Kultursystem durchgeführt.

Retinakultursysteme sind etablierte Modelle zur Untersuchung der Retina (Seigel, 1999). Retinospheroid, auch Re-Aggregations-Retina-Kulturen genannt, sind sehr gut geeignet, um Zelldifferenzierung, Entwicklung und „Wiederherstellung“ der Retina zu erforschen, und könnten deswegen in der Stammzellforschung eingesetzt werden (Layer *et al*, 2001). Die Retinospheroid-Kultur ermöglicht es, Zell-Zell-Erkennung, Aggregation, Proliferation etc. zu untersuchen. Mit diesem Kultursystem wurde zum Beispiel die Bedeutung des Pigment-Epithels für die Stratifizierung der Retina gezeigt (Vollmer *et al*, 1984 und 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde das System der organotypischen Retinakultur gewählt, weil in ihr die charakteristische Architektur der Retina vergleichbar mit der *In-Vivo*-Retina beibehalten wird und sich die verschiedenen retinalen Schichten normal ausbilden (Sassoe-Pognetto *et al*, 1996). Dies war Voraussetzung, um die Bedeutung von Munc13-1 für die zelluläre und synaptische Entwicklung zu untersuchen.

1. Zelluläre Analyse

Die immunzytochemischen Untersuchungen der einzelnen Zelltypen in den organotypischen Retinakulturen zeigten keine Unterschiede zwischen Munc13-1-ko und wt-Retina-Kulturen. Der einzige, statistisch aber nicht verifizierte Unterschied war, daß die Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen im Munc13-1-ko reduziert schien. Dieser Befund konnte durch das „poolen“ mehrerer Kulturen statistisch nicht belegt werden. Wahrscheinlich war die Variabilität

zwischen den gepoolten Kulturen zu stark (Freshny, 1992). Vergleicht man aber einzelne Kulturen miteinander, so stellt man teilweise eine starke Reduktion in der Zahl der Stäbchen-Bipolarzellen bei der Munc13-1-ko-Retina fest.

Man findet diesen Phänotyp - reduzierte Anzahl von Stäbchen-Bipolarzellen - ebenfalls an anderen KO-Systemen. Untersuchungen an einer Reelin-ko Maus und einer Dab-1-ko (disabled-1) Maus zeigen eine signifikante Reduktion der Stäbchen-Bipolarzellen. Reelin ist ein Glykoprotein, dessen Gen im Zusammenhang mit der „Zellpositionierung“ im sich entwickelnden Nervensystem gefunden wurde (D’Arcangelo *et al*, 1995). Dab-1 ist ein Adapter-Protein und scheint eine Rolle bei der Signal-Transduktion wandernder Neuronen zu spielen. Es gibt Hinweise darauf, daß es einen gemeinsamen Signal-Transduktionsweg von Reelin und Dab-1 gibt, an dem beide partizipieren (Benhayon *et al*, 2003). In der Retina wird Reelin von Ganglienzellen, Amakrinzellen und Zapfenbipolarzellen exprimiert, und Dab-1 von AII-Amakrinzellen. Sowohl in der „Reeler-Maus“, in der das Gen für Reelin mutiert ist, als auch in der Dab-1-ko-Maus ist die Anzahl von Stäbchen-Bipolarzellen reduziert. Die Autoren erklären diesen Phänotyp durch die gestörte synaptische Verbindung zwischen der Stäbchen-Bipolarzelle und der AII-Amakrinzelle (Rice *et al*, 2001).

Munc13-1 wird in der Retina präsynaptisch im Photorezeptor, postsynaptisch an der Stäbchen-Bipolarzell-Synapse in der OPL und an Amakrinzell-Synapsen in der IPL exprimiert. Fehlt Munc13-1, ist die synaptische Übertragung in der Retina stark beeinträchtigt und dies könnte sich in letzter Konsequenz in einer Reduktion der Stäbchen-Bipolarzellen auswirken. Ein Grund, warum nur die Bipolarzellen betroffen sind, könnte sein, daß sie die letzten Neuronen sind, die während der Retina-Entwicklung differenzieren (Marquardt und Gruss, 2002).

2. Synaptische Analyse

Neben der zellulären Untersuchung der organotypischen Retinakulturen wurden die Synapsen in der Munc13-1-ko Retina immunzytochemisch und ultrastrukturell untersucht.

Die Synapsenstruktur in den Retina-Kulturen von Munc13-1-ko-Mäusen ist vollkommen unverändert im Vergleich zu den Synapsen in wildtypischen Retina-Kulturen. Dies reiht sich in die Liste von Befunden an Synapsen ein, die defizient für präsynaptischen Proteine sind. So zeigten die Synapsen einer Munc18-1-ko-Maus, in der keine synaptische Transmitterfreisetzung mehr stattfindet, keinerlei morphologische Veränderungen (Verhage *et al*, 2000). Die Munc13-1-ko Maus, bei der immerhin 90% der glutamatergen Transmitter-Freisetzung ausgeschaltet ist, zeigt an den Synapsen im Gehirn ebenfalls keine

morphologischen Veränderungen (Augustin *et al*, 1999 b). Gleiches gilt für die Munc13-1-Munc13-2-„doppel-ko“ Mäuse (Varoqueaux *et al*, 2002). Diese Daten und die der vorliegenden Arbeit zeigen, das Munc13-1, wie auch Munc18-1 nicht für die Ausbildung von Synapsen verantwortlich ist.

Aktivität ist wichtig für die Ausbildung der synaptischen Verschaltung im Nervensystem (McMahon, 1974). Die Ausbildung von Synapsen im Gehirn ist sowohl genetisch bestimmt, als auch „erfahrungs“-abhängig: Die initiale Etablierung einer Synapse erfolgt genetisch, während die Nutzung (=Erfahrung) letztlich zur Verfeinerung/Ausreifung des synaptische Kontaktes führt (Zito und Svoboda, 2002). So führt beispielsweise das Aufziehen in Dunkelheit, was als Unterdrückung von Aktivität bestimmter Nervenzellen verstanden werden kann, zu Veränderungen der GABAergen Transmission im visuellen Cortex (Hubel und Wiesel, 1962, Morales *et al*, 2002).

In der Retina spielt Aktivität bei der Ausreifung der Ganglienzellen ebenfalls eine Rolle. Die Dendritenbäume der Alpha- und Beta-Ganglienzellen der Katze erlangen erst postnatal ihre endgültige Gestalt und Stratifizierungsebene in der IPL (Dann *et al*, 1988; Wässle, 1988). Bodnarenko *et al* (1995) konnten zeigen, daß die On- bzw Off-Stratifizierung der Ganglienzellen durch die Applikation von APB verhindert werden kann. APB blockiert die Freisetzung von Glutamat an den On-Bipolarzellen. Dies führt zur Ausbildung diffus stratifizierter Ganglienzellen, die auch physiologisch ein On-Off-Antwortverhalten zeigen, was auf veränderte synaptische Kontakte mit den Bipolarzellen hinweist (Bisti *et al*, 1998).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, daß bei keiner der untersuchten Munc13-knock-out Mäuse die Ausbildung der Retina beeinträchtigt ist und ferner die synaptische Ausbildung vollkommen normal ist, lassen sich zwei Überlegungen ableiten: Der Großteil der neuronalen Verschaltung in der Retina ist genetisch festgelegt und nicht aktivitätsabhängig. Es besteht außerdem die Möglichkeit, daß eine nicht-vesikuläre Freisetzung von Neurotransmitter stattfindet, die damit auch Munc13-unabhängig ist (Owens und Kriegstein, 2002) und so zur korrekten Ausbildung der Synapsen in der Retina oder im Gehirn führt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Nervensystem findet die Kommunikation zwischen Zellen an hochspezialisierten Kontaktstellen, den Synapsen statt. Die Information wird in Form von Neurotransmitter von einem Neuron auf ein anderes übertragen. Für die Freisetzung des Transmitters am präsynaptischen Neuron ist das Zusammenspiel verschiedener Proteine notwendig. Bei diesem Freisetzungemechanismus, der Exocytose, wird der neurotransmitter-gefüllte-Vesikel in die Nähe der präsynaptischen Membran gebracht, mit dieser quasi verankert und so nah herangezogen, bis er an die Membran andockt (Südhof, 1995). Der andockte Vesikel wird auf die Fusion vorbereitet, indem er das sogenannte „priming“ durchläuft. Nur ein geprimter Vesikel kann letztlich mit der Membran fusionieren und den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entlassen. Die Munc13-Proteine wurden als Priming-Faktoren an den Synapsen des Gehirns beschrieben, deren Fehlen dazu führt, daß kein Transmitter mehr freigesetzt wird (Augustin *et al*, 1999 b; Brose *et al*, 2000). In der Retina gibt es verschiedene Formen von Synapsen: die tonisch freisetzende Bandsynapse und die phasisch freisetzende konventionelle Synapse. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß Munc13-Proteine heterogen an den Synapsen der Retina verteilt sind: (I) Munc13-1 ist das *einzig*e Munc13-Protein, das präsynaptisch an den Bandsynapsen der Photorezeptoren vorkommt, (II) *keines* der Munc13-Proteine liegt präsynaptisch an den Bandsynapsen der Bipolarzellen vor und (III) alle Munc13-Proteine kommen an konventionellen Amakrinzell-Synapsen vor. Daraus können verschiedene Schlussfolgerungen gezogen werden: (i) Die Bandsynapsen der Photorezeptoren haben einen Munc13-1-abhängigen Freisetzungemechanismus. (ii) die Bandsynapsen der Bipolarzellen haben wahrscheinlich einen Munc13-unabhängigen Freisetzungemechanismus und unterscheiden sich damit grundlegend von den Bandsynapsen der Photorezeptoren. (iii) Die Lokalisation von Munc13-1 an den konventionellen Amakrinzell-Synapsen zeigt, daß Munc13-1 nicht nur mit tonisch freisetzenden, sondern auch mit phasisch freisetzenden Synapsen assoziiert ist. (iv) Die Expression von Kombinationen der Munc13-Proteine an den konventionellen Synapsen der Amakrinzellen belegt einen grundlegenden Unterschied in der Art der vesikulären Freisetzung zwischen Bandsynapsen und konventionellen Synapsen. Die Untersuchungen aller Munc13-ko Retinae zeigen, daß Munc13-1 das wichtigste der Munc13-Proteine ist und möglicherweise eine Rolle bei der Differenzierung der Stäbchen-Bipolarzellen spielt.

6 Anhang 1

Abb. 36: PKC α -Färbung am Vertikalschnitt der WT (13-1+/+) und munc13-1-knock-out-Kultur (13-1/-) Die Rekonstruktion zeigt die ganze Retina von inferior nach superior. Die Anzahl der Stäbchen-Bipolarzellen ist in der Munc13-1-ko-Retina-Kultur geringer als in der wt-Kultur. Maßstab: 50 μ m



7 Anhang 2

| PRÄSYNAPSE | | POSTSYNAPSE | |
|--------------------------|--|---|--|
| PROTEIN | FUNKTION | PROTEIN | FUNKTION |
| Bassoon | Lokalisation : aktive Zone Bildet vermutlich mit Piccolo das Grundgerüst der Cytomatrix an der aktiven Zone | CASK, Mint + MALS Komplex | Möglicherweise eine Brücke zwischen Prä- und Postsynaptische Elementen |
| b-Neurexin | Zelladhäsionsmolekül interagiert mit postsynaptischem Neuroligin | CASK (Calcium/Calmodulin-dependent kinase) | MAGUK verwandter, assoziiert u.a. mit Mint |
| Ca ²⁺ -Kanäle | Lokalisation: Plasmamembran Spannungsgesteuert; öffnen sich bei Eintreffen eines Aktionspotentials | CRIPT | Bindet PSD-95 Komplex an das Zytoskelett Bildet Komplex mit NMDAR |
| CaM | Rückkopplungshemmer der Ca ²⁺ Kanäle Wird durch einströmendes Ca ²⁺ aktiviert, bindet an den Glutamatrezeptor und inaktiviert ihn | GKAP = SAPAP (Guanylyl-Kinase-Assoziiertes Protein) | Bindet an MAGUK |
| CamKinase II | Reguliert Synapsin I | Glutamatrezeptoren | Ligandengesteuerte Ionenkanäle, die sowohl Na ⁺ als auch Ca ²⁺ in die postsynaptische Zelle leiten. |
| CASK | Gerüstfunktion in der Zytomatrix | GRIP1, GRIP2 (Glutamate-Receptor-Interacting-Proteins) | Proteine, die Glutamat-Rezeptoren binden |
| CAST | Lokalisation : Zytomatrix Bindet RIM1 und indirekt Munc13; Bassoon assoziiert | HOMER | Interagiert mit Gruppe I mGluR |
| Complexin | Lokalisation : aktive Zone Calciumsensor und Katalysator der Fusion von Vesikel | MAGUK (Membrane-Associated-Guanylyl-Kinase) | beteiligt an der Regulation von Glutamatrezeptoren vom AMPA-Typ |
| Kinesin | Ein Motorprotein, das eine Rolle beim Transport synaptischer Vesikel spielt | Neuroligin | Interagiert mit b- Neurexin und formt so einen trans-synaptischen Zelladhäsions-Komplex an der sich entwickelnden Synapse |
| Mint 1 | Gerüstfunktion in der Zytomatrix | NSF | Interagiert mit AMPA |
| Munc13 | Lokalisation: aktive Zone Priming-Faktor durch Interaktionen mit Syntaxin und RIM | PICK-1 | bindet GluR2/3, interagiert mit PKC |
| Munc18 | Lokalisation: überall an Plasmamembran Inhibiert durch Interaktion mit Syntaxin die Fusion der Vesikel | ProSAPs/SHANKS (proline-rich synapse-associated protein1) | übergeordnete Organisatoren der PSD. |
| NSF = sec18 | Löst den SNARE-Komplex auf und ermöglicht damit Fusion | PSD | Schlüsselstruktur zur Akkumulation und Verankerung von Neurotransmitter-Rezeptoren, Zelladhäsionsmolekülen und Komponenten der |

| | | | zellulären Signalverarbeitung |
|------------------------|--|--|----------------------------------|
| Piccolo | Lokalisation : aktive Zone Bildet vermutlich mit Bassoon das Grundgerüst der Cytomatrix an der aktiven Zone | | |
| Rab3 | Lokalisation : nur an synaptischen Vesikeln Reguliert die Fusion | | |
| RIBEYE | Protein des synaptischen Bandes Möglicherweise für den Aufbau des synaptischen Bandes verantwortlich | | |
| RIM | Rab3 Effektor, möglicherweise macht es einen Komplex zwischen synaptischer Plasmamembran und Vesikel, reguliert Konformationsänderung von Syntaxin | | |
| SAP | Synapsen-assoziiertes-Protein | | |
| SNAP-25 | Lokalisation: entlang der gesamten axonalen Membran: Plasmamembran-Fusions- Protein | | |
| SynapsinI, II | Vesikelprotein, das die Vesikel mit dem Zytoskelett verbindet | | |
| Synaptobrevin=VA MP | Vesikelprotein | | |
| Synaptophysin | Vesikelprotein | | |
| Synaptotagmin | Wird als Calciumsensor an der aktiven Zone diskutiert | | |
| Syntaxin | Lokalisation : über gesamte Plasmamembran verteilt Essentiell für Vesikel-Fusion (Priming) | | |
| VGluT1 | Befüllt Vesikel in der Präsynapse erregender Neuronen mit Glutamat (vesikulären Glutamat Transporter VGluT1/2) | | |

8 Literatur

Aravamudan B., Fergestad T., Davis W.S., Rodesch C.K., und Broadie K. (1999) *Drosophila* UNC-13 is essential for synaptic transmission. *Nature Neuroscience* 2, 965-971.

Ashery U., Varoqueaux F., Voets T., Betz A., Thakur P., Koch H., Neher E., Brose N., und Rettig J. (2000) Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J.* 19, 3586-3596.

Augustin I., Betz A., Herrmann C., Jo T., und Brose N. (1999a) Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem. J.* 337 (Pt 3), 363-371.

Augustin I., Rosenmund C., Südhof T.C., und Brose N. (1999b) Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* 400, 457-461.

Augustin I., Korte S., Rickmann M., Kretschmar H.A., Südhof T.C., Herms J.W., und Brose N. (2001) The cerebellum-specific Munc13 isoform Munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J. Neurosci.* 21, 10-17.

Baylor D.A., Fuortes M.G., und O'Bryan P.M. (1971a) Lateral interaction between vertebrate photoreceptors. *Vision Research* 11, 1195-1196.

Baylor D.A., Fuortes M.G., und O'Bryan P.M. (1971b) Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *J Physiol (Lond)* 214, 265-294.

Benhayon D., Magdaleno S., und Curran T. (2003) Binding of purified Reelin to ApoER2 and VLDLR mediates tyrosine phosphorylation of Disabled-1. *Molecular Brain Research* 112, 33-45.

Betz A., Okamoto M., Benseler F., und Brose N. (1997) Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 2520-2526.

Betz A., Ashery U., Rickmann M., Augustin I., Neher E., Südhof T.C., Rettig J., und Brose N. (1998) Munc13-1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21, 123-136.

Bisti S., Gargini C. und Chalupa L. M. (1998) Blockade of Glutamate-Mediated Activity in the Developing Retina Perturbs the Functional Segregation of ON and OFF Pathways. *J. Neurosci.* 18(13):5019-5025

Bodnarenko S.R., Jeyarasasingam G., und Chalupa L.M. (1995) Development and regulation of dendritic stratification in retinal ganglion cells by glutamate-mediated afferent activity. *J. Neurosci.* 15, 7037-7045.

- Boeckers T.M., Kreutz M.R., Winter C., Zuschratter W., Smalla K.H., Sanmarti-Vila L., Wex H., Langnaese K., Bockmann J., Garner C.C., und Gundelfinger E.D. (1999) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J. Neurosci.* 19, 6506-6518.
- Brandstätter J.H., Wässle H., Betz H., und Morgans C.W. (1996 a) The plasma membrane protein SNAP-25, but not syntaxin, is present at photoreceptor and bipolar cell synapses in the rat retina. *European Journal of Neuroscience* 8, 823-828.
- Brandstätter J.H., Löhrke S., Morgans C.W., und Wässle H. (1996 b) Distributions of two homologous synaptic vesicle proteins, synaptoporin and synaptophysin, in the mammalian retina. *The Journal of Comparative Neurology* 370, 1-10.
- Brandstätter J.H., Koulen P., und Wässle H. (1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research* 38, 1385-1397.
- Brandstätter J.H., Fletcher E.L., Garner C.C., Gundelfinger E.D., und Wässle H. (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *European Journal of Neuroscience* 11, 3683-3693.
- Brandstätter J.H. und Hack I. (2001) Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. *Cell and Tissue Research* 303, 1-14.
- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Brose N., Hofmann K., Hata Y., und Südhof T.C. (1995) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 25273-25280.
- Brose N., Rosenmund C., und Rettig J. (2000) Regulation of transmitter release by Unc-13 and its homologues. *Current Opinion in Neurobiology* 10, 303-311.
- Brugger B., Nickel W., Weber T., Parlati F., McNew J.A., Rothman J.E., und Sollner T. (2000) Putative fusogenic activity of NSF is restricted to a lipid mixture whose coalescence is also triggered by other factors. *EMBO J.* 19, 1272-1278.
- Cases-Langhoff C., Voss B., Garner A.M., Appeltauer U., Takei K., Kindler S., Veh R.W., De Camilli P., Gundelfinger E.D., und Garner C.C. (1996) Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 214-223.
- Constantine-Paton M. und Cline H.T. (1998) LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. *Current Opinion in Neurobiology* 8, 139-148.
- Copenhagen D.R. und Jahr C.E. (1989) Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature* 341, 536-539.
- Czihak G., Langer H. und Ziegler H., (1992) BIOLOGIE, 5. Auflage, Springer Verlag Berlin/Heidelberg.
- D'Arcangelo G., Miao G.G., Chen S.C., Soares H.D., Morgan J.I., und Curran T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* 374, 719-723.

- Dann J.F., Buhl E.H., und Peichl L. (1988) Postnatal dendritic maturation of alpha and beta ganglion cells in cat retina. *J. Neurosci.* 8, 1485-1499.
- DeVries S.H. und Baylor D.A. (1993) Synaptic circuitry of the retina and olfactory bulb. *Cell* 72 Suppl., 139-149.
- Dick O., Hack I., Altrock W.D., Garner C.C., Gundelfinger E.D., und Brandstätter J.H. (2001) Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *The Journal of Comparative Neurology* 439, 224-234.
- Ding Y.Q., Shigemoto R., Takada M., Ohishi H., Nakanishi S., und Mizuno N. (1996) Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 364, 290-310.
- Dowling J.E. und Boycott B.B. (1966) Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond. B* 166, 80-111.
- Dowling J.E. (1987) The Retina. *The Belknap Press of Harvard University Press* Cambridge, MA and London.
- Dunlap K., Luebke J.I., und Turner T.J. (1995) Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends in Neurosciences* 18, 89-98.
- Enz R., Brandstätter J.H., Wässle H., und Bormann J. (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_A receptor rho subunits in the mammalian retina. *J. Neurosci.* 16, 4479-4490.
- Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., und Jahn R. (1998 a) Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15781-15786.
- Fasshauer D., Eliason W.K., Brunger A.T., und Jahn R. (1998 b) Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37, 10354-10362.
- Flock A. (1964) Structure of the macula utriculi with special reference to the directional interplay of sensory responses as revealed by morphological polarisation. *Journal of Cell Biology* 22, 413-431.
- Freshny R.I. (1992) Animal Cell Culture: a practical approach. *Oxford University Press, UK and Europe*, 1992 2nd Edition.
- Frishman L. J. und Steinberg R. H. (1989), Intraretinal analysis of the threshold dark-adapted ERG of cat retina *J Neurophysiol* 61: 1221-1232.
- Gabriel R. und Witkovsky P. (1998) Cholinergic, but not the rod pathway-related glycinergic (AII), amacrine cells contain calretinin in the rat retina. *Neuroscience Letters* 247, 179-182.
- Hack I., Frech M., Dick O., Peichl L., und Brandstätter J.H. (2001) Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the photoreceptor synapses of rodent retina. *European Journal of Neuroscience* 13, 15-24.

- Hata Y., Slaughter C.A., und Südhof T.C. (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.
- Haverkamp S. und Wässle H. (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology* 424, 1-23.
- Haverkamp S., Ghosh K.K., Hirano A.A., und Wässle H. (2003) Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *The Journal of Comparative Neurology* 455, 463-476.
- Heidelberger R. und Matthews G. (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J Physiol (Lond)* 447, 235-256.
- Hollmann M. und Heinemann S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual Review of Neuroscience* 17, 31-108.
- Hopsu V.K. und Arstilla A.U. (1964) An apparent somato-somatic synaptic structure in the pineal gland of the rat. *Experimental Cell Research* 37, 484-487.
- Hubel, D. und Wiesel, T. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol (Lond)*, 160, 106-154.
- Jahn R. und Südhof T.C. (1999) Membrane fusion and exocytosis. *Annual Review of Biochemistry* 68, 863-911.
- Kamermans M. und Spekreijse H. (1999) The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look ahead. *Vision Research* 39, 2449-2468.
- Kandel E.R.H., Schwartz J.H., und Jessel T.M. (1996) Neurowissenschaften: eine Einführung. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Kidd M. (1962) Electron microscopy of the inner plexiform layer of the retina in the cat and pigeon. *Journal of Anatomy* 96, 179-188.
- Kirsch J., Wolters I., Triller A., und Betz H. (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366, 745-748.
- Kneussel M., Haverkamp S., Fuhrmann J.C., Wang H., Wässle H., Olsen R.W., und Betz H. (2000) The gamma-aminobutyric acid type A receptor (GABA_AR)-associated protein GABARAP interacts with gephyrin but is not involved in receptor anchoring at the synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8594-8599.
- Kneussel M., Brandstätter J.H., Gasnier B., Feng G., Sanes J.R., und Betz H. (2001) Gephyrin-independent clustering of postsynaptic GABA(A) receptor subtypes. *Mol. Cell Neurosci.* 17, 973-982.
- Kohn R.E., Duerr J.S., McManus J.R., Duke A., Rakow T.L., Maruyama H., Moulder G., Maruyama I.N., Barstead R.J., und Rand J.B. (2000) Expression of multiple UNC-13 proteins in the *Caenorhabditis elegans* nervous system. *Mol. Biol. Cell* 11, 3441-3452.
- Kreienkamp H.J., Zitzer H., Gundelfinger E.D., Richter D., und Bockers T.M. (2000) The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts

with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 32387-32390.

Layer P.G., Rothermel A., and Willbold E. (2001) From stem cells towards neural layers: a lesson from re-aggregated embryonic retinal cells. *Neuroreport* 12, A39-A46.

Lin R.C. und Scheller R.H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 19-49.

Lu W., Man H., Ju W., Trimble W.S., MacDonald J.F., und Wang Y.T. (2001) Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* 29, 243-254.

Luo Y.R. (1999) Why is the human visual system sensitive only to light of wavelengths from approximately 760 to 380 nm? An answer from thermochemistry and chemical kinetics. *Biophys. Chem.* 83, 179-184.

Mandell J.W., Townes-Anderson E., Czernik A.J., Cameron R., Greengard P., und De Camilli P. (1990) Synapsins in the vertebrate retina: absence from ribbon synapses and heterogeneous distribution among conventional synapses. *Neuron* 5, 19-33.

Marquardt T. und Gruss P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosciences* 25, 32-38.

Maruyama I.N. und Brenner S. (1991) A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5729-5733.

Massey S.C. (1990) Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Progress in Retinal Research*. 9, 399-425.

McIntire S.L., Reimer R.J., Schuske K., Edwards R.H., und Jorgensen E.M. (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-876.

McMahon D. (1974) Chemical messengers in development: a hypothesis. *Science* 185, 1012-1021.

Missotten L. (1965) The ultrastructure of the human retina. *Arschia Uitgaven N.V., Brussels*.

Misura K.M., Scheller R.H., und Weis W.I. (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362.

Morales B., Choi S.Y., und Kirkwood A. (2002) Dark rearing alters the development of GABAergic transmission in visual cortex. *J. Neurosci.* 22, 8084-8090.

Morgans C.W., Brandstätter J.H., Kellerman J., Betz H., und Wässle H. (1996) A SNARE complex containing syntaxin 3 is present in ribbon synapses of the retina. *J. Neurosci.* 16, 6713-6721.

Nishimune A., Isaac J.T., Molnar E., Noel J., Nash S.R., Tagaya M., Collingridge G.L., Nakanishi S., und Henley J.M. (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21, 87-97.

- Noel J., Ralph G.S., Pickard L., Williams J., Molnar E., Uney J.B., Collingridge G.L., and Henley J.M. (1999) Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron* 23, 365-376.
- Osten P., Srivastava S., Inman G.J., Vilim F.S., Khatri L., Lee L.M., States B.A., Einheber S., Milner T.A., Hanson P.I., und Ziff E.B. (1998) The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP- dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* 21, 99-110.
- Otter-Nilsson M., Hendriks R., Pecheur-Huet E.I., Hoekstra D., und Nilsson T. (1999) Cytosolic ATPases, p97 and NSF, are sufficient to mediate rapid membrane fusion. *EMBO J.* 18, 2074-2083.
- Owens D.F. und Kriegstein A.R. (2002) Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36, 989-991.
- Pattnaik B., Jellali A., Sahel J., Dreyfus H., und Picaud S. (2000) GABA_C receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J. Neurosci.* 20, 6789-6796.
- Peichl L. (1992) Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere. *Biologie in unserer Zeit* 22, 45-53.
- Pow D.V., Wright L.L., und Vaney D.I. (1995) The immunocytochemical detection of amino-acid neurotransmitters in paraformaldehyde-fixed tissues. *Journal of Neuroscience Methods* 56, 115-123.
- Rao-Mirotznik R., Harkins A.B., Buchsbaum G., und Sterling P. (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14, 561-569.
- Raviola E. und Gilula N.B. (1975) Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *The Journal of Cell Biology* 65, 192-222.
- Reim K., Mansour M., Varoqueaux F., McMahon H.T., Südhof T.C., Brose N., und Rosenmund C. (2001) Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104, 71-81.
- Rhee J.S., Betz A., Pyott S., Reim K., Varoqueaux F., Augustin I., Hesse D., Südhof T.C., Takahashi M., Rosenmund C., und Brose N. (2002) Beta phorbol ester- and diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108, 121-133.
- Rice D.S., Nusinowitz S., Azimi A.M., Martinez A., Soriano E., und Curran T. (2001) The reelin pathway modulates the structure and function of retinal synaptic circuitry. *Neuron* 31, 929-941.
- Richmond J.E., Davis W.S., und Jørgensen E.M. (1999) UNC-13 is required for synaptic vesicle fusion in *C. elegans*. *Nature Neuroscience* 2, 959-964.
- Richmond J.E., Weimer R.M., und Jørgensen E.M. (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature* 412, 338-341.

- Richter K., Langnaese K., Kreutz M.R., Olias G., Zhai R., Scheich H., Garner C.C., und Gundelfinger E.D. (1999) Presynaptic cytomatrix protein bassoon is localized at both excitatory and inhibitory synapses of rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 408, 437-448.
- Rieke F. und Schwartz E.A. (1994) A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron* 13, 863-873.
- Rieke F. und Schwartz E.A. (1996) Asynchronous transmitter release: control of exocytosis and endocytosis at the salamander rod synapse. *J Physiol (Lond)* 493 (Pt 1), 1-8.
- Rizo J. und Südhof T.C. (2002) SNAREs and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 641-653.
- Rodieck R.W. (1998) *The First Steps in Seeing*, Sinauer Associates, INC. Publishers Sunderland, Massachusetts
- Rosenmund C., Sigler A., Augustin I., Reim K., Brose N., und Rhee J.S. (2002) Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33, 411-424.
- Rothman J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Sagne C., El Mestikawy S., Isambert M.F., Hamon M., Henry J.P., Giros B., und Gasnier B. (1997) Cloning of a functional vesicular GABA and glycine transporter by screening of genome databases. *FEBS Letters* 417, 177-183.
- Sandell J.H. und Masland R.H. (1986) A system of indoleamine-accumulating neurons in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 6, 3331-3347.
- Sassa T., Harada S., Ogawa H., Rand J.B., Maruyama I.N., und Hosono R. (1999) Regulation of the UNC-18-Caenorhabditis elegans syntaxin complex by UNC- 13. *J. Neurosci.* 19, 4772-4777.
- Sassoe-Pognetto M., Feigenspan A., Bormann J., und Wässle H. (1996) Synaptic organization of an organotypic slice culture of the mammalian retina. *Visual Neuroscience* 13, 759-771.
- Satoh H., Aoki K., Watanabe S.I., und Kaneko A. (1998) L-type calcium channels in the axon terminal of mouse bipolar cells. *Neuroreport* 9, 2161-2165.
- Scannevin R.H. und Huganir R.L. (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 1, 133-141.
- Schmitz F., Augustin I., und Brose N. (2001) The synaptic vesicle priming protein Munc13-1 is absent from tonically active ribbon synapses of the rat retina. *Brain Research* 895, 258-263.
- Seidenbecher C.I., Langnaese K., Sanmarti-Vila L., Boeckers T.M., Smalla K.H., Sabel B.A., Garner C.C., Gundelfinger E.D., und Kreutz M.R. (1998) Caldendrin, a novel neuronal calcium-binding protein confined to the somato-dendritic compartment. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 21324-21331.

- Seigel G.M. (1999) The golden age of retinal cell culture. *Molecular Vision* 5, 4.
- Sheng M. und Kim M.J. (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298, 776-780.
- Sjöstrand S.F. (1953) The ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye. *Journal of Applied Physics* 24, 1422.
- Sjöstrand S.F. (1958) Ultrastructure of retinal rod synapses of the guinea pig eye as revealed by three-dimensional reconstructions from serial sections. *Journal of Ultrastructural Research* 2, 122-170.
- Smith C.A. und Sjöstrand S.F. (1961) A synaptic structure in the hair cells of the guinea pig cochlea. *Journal of Ultrastructural Research* 5, 184-193.
- Söllner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H., und Rothman J.E. (1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Söllner T. und Rothman J.E. (1994) Neurotransmission: harnessing fusion machinery at the synapse. *Trends in Neurosciences* 17, 344-348.
- Song I., Kamboj S., Xia J., Dong H., Liao D., und Huganir R.L. (1998) Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21, 393-400.
- Sörensen J.B., Matti U., Wei S.H., Nehring R.B., Voets T., Ashery U., Binz T., Neher E., und Rettig J. (2002) The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1627-1632.
- Strettoi E., Dacheux R.F., und Raviola E. (1990) Synaptic connections of rod bipolar cells in the inner plexiform layer of the rabbit retina. *The Journal of Comparative Neurology*. 295, 449-466.
- Strom T.M., Nyakatura G., Apfelstedt-Sylla E., Hellebrand H., Lorenz B., Weber B.H., Wutz K., Gutwillinger N., Ruther K., Drescher B., Sauer C., Zrenner E., Meitinger T., Rosenthal A., und Meindl A. (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genetics* 19, 260-263.
- Südhof T.C. (1995) The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.
- Sutton R.B., Fasshauer D., Jahn R., und Brunger A.T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Takahashi T. und Momiyama A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366, 156-158.
- Takamori S., Rhee J.S., Rosenmund C., und Jahn R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194.
- Tarsa L. und Goda Y. (2002) Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 1012-1016.

Taylor W.R. und Morgans C. (1998) Localization and properties of voltage-gated calcium channels in cone photoreceptors of *Tupaia belangeri*. *Visual Neuroscience* 15, 541-552.

Tessier-Lavigne M. und Goodman C.S. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science* 274, 1123-1133.

tom Dieck S., Sanmarti-Vila L., Langaese K., Richter K., Kindler S., Soyke A., Wex H., Smalla K.H., Kampf U., Franzer J.T., Stumm M., Garner C.C., und Gundelfinger E.D. (1998) Bassoon, a novel zinc-finger CAG/glutamine-repeat protein selectively localized at the active zone of presynaptic nerve terminals. *The Journal of Cell Biology* 142, 499-509.

tom Dieck S. und Gundelfinger, E.D. (2000) Chemische Synapsen des Zentralnervensystems. *Chemie in unserer Zeit* 34, 140-148.

Vaney D.I. (1986) Morphological identification of serotonin-accumulating neurons in the living retina. *Science* 233, 444-446.

Vaney D.I., Nelson J.C., und Pow D.V. (1998) Neurotransmitter coupling through gap junctions in the retina. *J. Neurosci.* 18, 10594-10602.

Vardi N., Matesic D.F., Manning D.R., Liebman P.A., und Sterling P. (1993) Identification of a G-protein in depolarizing rod bipolar cells. *Visual Neuroscience* 10, 473-478.

Vardi N. (1998) Alpha subunit of G_o localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells. *The Journal of Comparative Neurology* 395, 43-52.

Varoqueaux F., Sigler A., Rhee J.S., Brose N., Enk C., Reim K., und Rosenmund C. (2002) Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9037-9042.

Verhage M., Maia A.S., Plomp J.J., Brussaard A.B., Heeroma J.H., Vermeer H., Toonen R.F., Hammer R.E., van den Berg T.K., Missler M., Geuze H.J., und Südhof T.C. (2000) Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.

Veruki M.L. und Hartveit E. (2002) AII (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron* 33, 935-946.

Vollmer G., Layer P.G., und Gierer A. (1984) Reaggregation of embryonic chick retina cells: pigment epithelial cells induce a high order of stratification. *Neuroscience Letters* 48, 191-196.

Vollmer G. und Layer P.G. (1986) An in vitro model of proliferation and differentiation of the chick retina: coaggregates of retinal and pigment epithelial cells. *J. Neurosci.* 6, 1885-1896.

Wagner H.J. (1997) Presynaptic bodies ("ribbons"): from ultrastructural observations to molecular perspectives. *Cell and Tissue Research* 287, 435-446.

Wässle H. (1988) Dendritic maturation of retinal ganglion cells. *Trends in Neurosciences* 11, 87-89.

- Wässle H. und Boycott B.B. (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews* 71, 447-480.
- Weber T., Zemelman B.V., McNew J.A., Westermann B., Gmachl M., Parlati F., Sollner T.H., und Rothman J.E. (1998) SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
- Wehner R. und Gehring W. (1995) Zoologie, 23. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- Wheeler D.B., Randall A., und Tsien R.W. (1994) Roles of N-type and Q-type Ca^{2+} channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107-111.
- Yang C.B., Zheng Y.T., Li G.Y., und Mower G.D. (2002) Identification of Munc13-3 as a candidate gene for critical-period neuroplasticity in visual cortex. *J. Neurosci.* 22, 8614-8618.
- Zhang J., Li W., Trexler E.B., und Massey S.C. (2002) Confocal analysis of reciprocal feedback at rod bipolar terminals in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 22, 10871-10882.
- Zito K. und Svoboda K. (2002) Activity-dependent synaptogenesis in the adult Mammalian cortex. *Neuron* 35, 1015-1017.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Heinz Wässle für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Neuroanatomie am MPI für Hirnforschung und die anregenden Diskussionen in den Seminaren.

Herrn PD Dr. L. Peichl und Herrn PD Dr. J.H. Brandstätter danke ich herzlich für die besondere Betreuung der Arbeit, die vielen aufschlussreichen Diskussionen und ständige Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Herrn Prof. Dr. Paul Layer möchte ich herzlich für die Betreuung dieser Arbeit, die Möglichkeit jederzeit am Arbeitsgruppenseminar aktiv teilnehmen zu dürfen, sowie für die fruchtbaren Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Josef Ammermüller danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme in Oldenburg und seine hilfreiche Unterstützung bei der Lösung essentieller Probleme.

Herrn Prof. Dr. Nils Brose, Frau Dr. Kerstin Reim und Frau Dr. Frederique Varoqueaux danke ich für Bereitstellung grundlegender Arbeitsmittel: die knock-out Mäuse und die Antikörper!

Ganz besonders danke ich auch Dr. Dieter Engelkamp, der mich in die Geheimnisse der *In-Situ* einwies und mich immer hilfreich unterstützt hat!

Anja Hildebrand danke ich nicht nur für Ihre Hilfe bei meinen Experimenten, sondern auch für die schöne Zeit im Labor.

Herzlicher Dank geht auch an Frau Gong-Sun Nam und Herrn Walter Hofer für die exzellente Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie.

Ein großer Dank geht an Nina Viktoria Pfau, mit der ich seit drei Jahren eng zusammenarbeite und vieles teile.

Ich danke außerdem der gesamten Arbeitsgruppe Neuroanatomie für die überaus freundschaftliche Aufnahme, Unterstützung und Hilfe nicht nur bei der Arbeit.

LEBENS LAUF

Name : Monika Altwein
Geburtsdatum : 28.05.1973 in Darmstadt
Familienstand : ledig
Staatsangehörigkeit : deutsch

Ausbildung

1979-1983 Heinrich-Hoffmann-Schule Darmstadt

1983-1992 Ludwig-Georgs-Gymnasium Darmstadt

1992 Abitur am Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt

1992-1993 2 Semester Chemiestudium an der TH Darmstadt

1993-1997 Biologiestudium an der TH Darmstadt, Abschluss Vordiplom

1997-1998 Biologiestudium an der Bayerischen Julius Maximilians-Universität Würzburg, Abschluss Diplom

1999-2000 Diplomarbeit an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg am Lehrstuhl für Verhaltensphysiologie und Soziobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Tautz mit dem Thema: Beeinflussung des olfaktorischen System der Honigbiene durch Zinksulfat

2000-2003 Promotion am Max-Planck-Institut für Hirnforschung in Frankfurt, Abteilung Neuroanatomie unter der Betreuung von PD Dr. L. Peichl

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.